



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113993842 B

(45) 授权公告日 2024.07.16

(21) 申请号 202080043350.X

马克·理查德·法梅里

(22) 申请日 2020.06.18

史蒂文·詹姆斯·莫斯

(65) 同一申请的已公布的文献号

李·罗伯特·韦伯斯特

申请公布号 CN 113993842 A

马修·艾伦·格雷戈里

(43) 申请公布日 2022.01.28

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(30) 优先权数据

专利代理人 杜兆东

PA201970384 2019.06.19 DK

(51) Int.CI.

PA201970383 2019.06.19 DK

C07C 327/30 (2006.01)

PA201970382 2019.06.19 DK

A61K 31/265 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 8/46 (2006.01)

2021.12.13

A61Q 19/08 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 3/10 (2006.01)

PCT/EP2020/066923 2020.06.18

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 25/00 (2006.01)

W02020/254484 EN 2020.12.24

A61P 1/16 (2006.01)

(73) 专利权人 爱博利瓦有限公司

A61P 9/06 (2006.01)

地址 瑞典兰德

A61P 25/08 (2006.01)

(72) 发明人 芒努斯·约阿基姆·汉松

(56) 对比文件

阿尔瓦尔·格伦贝格

CN 106458957 A, 2017.02.22

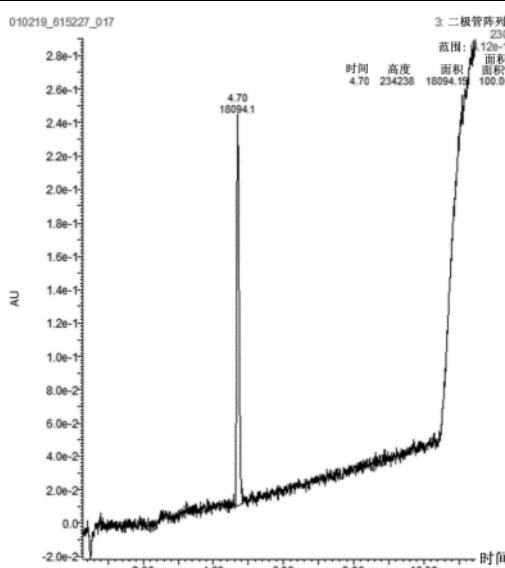
马茨·埃斯基尔·埃尔默

审查员 陈瑜

B

权利要求书1页 说明书56页 附图26页

(54) 发明名称



琥珀酸酯前药、包含琥珀酸酯前药的组合物

及其用途

(57) 摘要

本发明提供作为游离化合物或其盐、水合物、溶剂化物或络合物的新型分离的琥珀酸酯前药，其是细胞渗透性的并且旨在提高线粒体中的ATP生产。该化合物适用于一系列疾病的医学治疗、用于营养补充剂、用于营养化妆品和用于化妆品。

1. 一种固体形式的分离的化合物1, 其中所述分离的化合物1为3-[(2-乙酰氨基乙硫基) 羰基]丙酸甲酯, 其中所述分离的化合物1是晶体产物, 其具有在以下值±0.2度, 2-θ值处具有信号的X-射线粉末衍射图: 21.4、22.2、22.8、23.1和23.3; 或所述分离的化合物1是晶体产物, 其具有在以下值±0.2度, 2-θ值处具有信号的X-射线粉末衍射图: 10.9、13.1、14.9、16.2、20.1、24.0、24.8、26.1; 或所述分离的化合物1为其I型晶体多晶型物的形式, 具有在以下值±0.2度, 2-θ值处具有信号的X-射线粉末衍射图: 11.2、16.9、22.2、23.3、24.0。
2. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 其中所述分离的化合物1为3-[(2-乙酰氨基乙硫基) 羰基]丙酸甲酯, 并且具有至少80%w/w的纯度。
3. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 其中所述分离的化合物1为3-[(2-乙酰氨基乙硫基) 羰基]丙酸甲酯, 并且具有至少90%w/w的纯度。
4. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 其中所述分离的化合物1为3-[(2-乙酰氨基乙硫基) 羰基]丙酸甲酯, 并且具有至少95%w/w的纯度。
5. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 其中所述分离的化合物1为3-[(2-乙酰氨基乙硫基) 羰基]丙酸甲酯, 并且具有至少97%w/w的纯度。
6. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 其中所述分离的化合物1为3-[(2-乙酰氨基乙硫基) 羰基]丙酸甲酯, 并且具有至少98%w/w的纯度。
7. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 其中所述分离的化合物1为3-[(2-乙酰氨基乙硫基) 羰基]丙酸甲酯, 并且具有至少99%w/w的纯度。
8. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 所述分离的化合物1为游离形式或其盐的形式。
9. 根据权利要求1所述的分离的化合物1, 具有35-55℃范围内的熔点或熔程。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的分离的化合物1, 具有的室温下水溶解度为至少300 mg/mL。
11. 根据权利要求10所述的分离的化合物1, 其中所述室温下水溶解度处于300 mg/mL-900 mg/mL的范围内。
12. 根据权利要求1-9中任一项所述的分离的化合物1, 具有0-100%范围内的结晶度。
13. 根据权利要求12所述的分离的化合物1, 具有50%-100%范围内的结晶度。
14. 根据权利要求1-9中任一项所述的分离的化合物1, 具有对应于0.005-0.2 s<sup>-1</sup>范围内的速率常数的动力学水溶解度。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的分离的化合物1在制备用于治疗或预防线粒体功能障碍相关疾病的药物中的用途。
16. 根据权利要求1-14中任一项所述的分离的化合物1在制备用于治疗或预防线粒体障碍症、线粒体能量缺乏症、药物诱导线粒体副作用的药物中的用途。
17. 根据权利要求1-14中任一项所述的分离的化合物1在制备用于治疗或预防Leigh综合征、LHON、MELAS、红色纤维参差不齐的肌阵挛性癫痫的药物中的用途。

## 琥珀酸酯前药、包含琥珀酸酯前药的组合物及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学、药理活性化合物、包含此类化合物的药物组合物和营养的领域。具体而言,本发明涉及适用作药物和营养补充剂的琥珀酸酯的细胞可渗透性前体。

### 背景技术

[0002] 线粒体是真核细胞中产生用作能量来源的大部分细胞三磷酸腺苷(ATP)供应的细胞器。因此,线粒体对于能量生产、真核细胞存活和正常细胞功能是必不可少的。除了提供能量外,线粒体还参与许多其他过程,如氧化还原和离子平衡、细胞信号传导、细胞分化、细胞死亡,以及代谢过程、细胞周期和细胞生长的控制。具体而言,线粒体是细胞凋亡的关键调节剂,并且它们还在多种形式的非凋亡细胞死亡(如坏死)中发挥重要作用。

[0003] 线粒体功能障碍会导致多种疾病,并能够由线粒体或核基因组中的突变或缺失、线粒体呼吸系统的原发性或继发性损伤或与异常线粒体功能相关的其他机制引起。目前还没有能够治愈线粒体疾病的可用治疗方法。

[0004] 通过三羧酸循环和电子传递链中的一系列化学反应,营养物质氧化产生ATP形式的可用化学能在很大程度上都发生于线粒体中。三羧酸循环中生成的NADH会进料至电子传递链中的络合物I中。琥珀酸酯是线粒体中三羧酸循环的代谢中间体,而其独特之处在于它被电子传输链中的络合物II的琥珀酸脱氢酶直接代谢。琥珀酸酯还能够充当反映细胞代谢状态的信令分子。

[0005] 鉴于维持或恢复正常线粒体功能或增强细胞能量生产(ATP)在治疗线粒体功能障碍相关疾病和病症或增强线粒体功能中的已知重要性,仍然需要具有细胞渗透性、释放胞内琥珀酸酯或琥珀酸酯前体的能力、化合物和胞内释放副产物的低毒性以及与给药于受试者或患者一致的物理化学性质的化合物。

[0006] 琥珀酸酯化合物已作为其他活性剂的前药进行了制备,例如WO 2002/28345描述了琥珀酸双(2,2-二甲基丙酰氧基甲基)酯、琥珀酸二丁酰氧基甲基酯和琥珀酸双-(1-丁酰氧基-乙基)酯。所制备的这些化合物会释放甲醛,与现有化合物相比,它们专注不同的医疗用途。

[0007] 各种琥珀酸酯化合物在本领域内是已知的。

[0008] WO 97/47584公开了包含多个连接至一起的琥珀酸酯部分的多醇琥珀酸酯。

[0009] WO 2015/155231公开了具有细胞渗透性的琥珀酸酯和琥珀酸酯前体。

[0010] MurlIet al. (Appl. Environ. Microbiol. 71:2005:4503-4509)公开了通过喂养细菌大肠杆菌和天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)酰基硫酯而尝试进行6-脱氧赤藓糖醇B类似物的化学生物合成。结构表公开了各种酰基硫酯,包括3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯的正式结构,但合成失败,而未得到所需的产物。

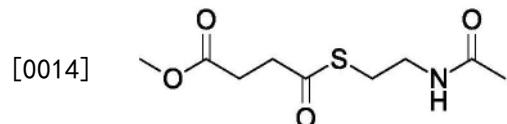
[0011] 通过提供代谢底物对于起源于线粒体功能障碍的疾病或增强代谢的有效且安全的新治疗选择,仍存需要。对于用于刺激受试者的能量并用作抗氧化剂的新型营养补充剂、营养化妆品、药妆品和化妆品,仍存需要。此类新疗法、营养补充剂、营养化妆品、药妆品和

化妆品需要具有诱人的性能组合,包括增强线粒体能量生产和/或用作抗氧化剂的高活性、良好生物利用度、长血浆半衰期、配制成产品时的稳定性、低毒性。具体而言,对于基于水中具有高溶解度、良好细胞渗透性和需要时具有高血脑屏障渗透性和/或降低乳酸酯产量的活性成分的这种新治疗剂、营养补充剂、营养化妆品、药妆品和化妆品,仍存需要。

## 发明内容

[0012] 在第一方面中,本发明提供了固体形式的分离3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯(化合物1)。它可以是其游离形式或盐、水合物、溶剂化物或络合物。

[0013] 化合物1具有以下结构(式1) :



[0015] 现在令人惊讶的是,据发现,细胞可渗透化合物1具有显著有利性能的组合。它具有刺激线粒体能量生产的强效体内活性,并具有良好的口服生物利用度、血脑屏障穿透力、良好血浆稳定性,并降低乳酸产生和重塑琥珀酸水平。同时,化合物1在水和水性体系中具有非常高的溶解度。溶解度评估表明溶解度超过500mg/mL,这相当于~2.1M。这种极高的水溶解度可能来自化合物1的低熔点(低于55°C),并且在添加水性溶剂时,能够与水性溶剂混溶。这能够实现非常高浓度的水性制剂,从而允许化合物的高口服剂量,该化合物实际上是代谢底物的前药。

[0016] 在一个实施方式中,所述分离化合物1是熔点或熔程范围为约35-约55°C的固体产品。在优选的实施方式中,该分离化合物1具有的纯度为至少80%w/w,如至少85%w/w、至少90%w/w,如至少95%w/w,但它还可以具有较低的纯度,如至少30%w/w、至少40%w/w、至少45%w/w、至少50%w/w、至少55%w/w、至少60%w/w、至少65%w/w、至少70%w/w或至少75%w/w。取决于生产方法和储存条件,化合物1可以包含晶体和/或它可以包含非晶体,如无定形形式的化合物1及其混合物。根据本文的实施例能够看出,所用的所有方法均导致产生具有一定结晶度的化合物1。

[0017] 预期化合物1可能存在不止一种晶型,并且化合物1也可以作为无定形固体存在。在本申请上下文中,化合物1的所有形式均在本申请的范围内,包括两种或更多多种形式的化合物1的混合物。因此,术语“化合物1”表示固体形式的式1化合物,但不考虑化合物是否为结晶形式、无定形形式、粉末形式的多晶形式或其混合物。

[0018] 具体而言,据已经发现,化合物1具有多种具有不同性质的固体形式。例如,作为无定形固体或主要为无定形固体,它显示出更高的动力学溶解度。它还具有结晶形式(或主要是结晶形式),这些结晶形式当作为固体形式处理时,已经产生并显示出其他改进的特性。还据发现,纯度会影响制剂的性质。具体而言,熔点低,接近体温,并因杂质的存在而改变。化合物1制剂的稳定性也会因杂质的存在而改变,如非纯水中的杂质,这会降低化合物1的稳定性。

[0019] 在第二方面中,本发明提供了一种包含分离化合物1的组合物。

[0020] 在第三方面中,本发明提供了包含分离化合物1的药妆品。

[0021] 在第四方面中,本发明提供了一种包含分离化合物1的营养化妆品。

[0022] 在第五方面中,本发明提供了一种制备分离化合物1的工艺方法,所述工艺方法包括以下步骤:

[0023] a) 在偶联剂的存在下,在0-100°C下,使N-乙酰半胱胺和琥珀酸单甲酯在有机溶剂中进行反应,

[0024] b) 分离出化合物1,

[0025] 从而提供分离化合物1。

[0026] 该工艺方法通常包括提纯步骤以提高所述化合物的纯度。

[0027] 本发明的化合物1化合物能够用于增强或重塑线粒体中的能量生产。值得注意的是,这些化合物能够用于药物、营养化妆品、营养补充剂、药妆品和化妆品。化合物1化合物能够用于预防或治疗具有与线粒体功能障碍和/或与能量(ATP)缺乏相关的组分的障碍或疾病,以及利用琥珀酸的细胞信号传递特性及其对代谢中间体的回补效应(anaplerotic effect)。

[0028] 此外,与已知的琥珀酸酯前药(例如,在WO 97/47584中提及)相比,本发明的分离化合物1显示出用于治疗和用作营养补充剂和化妆品的改进特性,包括更好的细胞渗透性、更长的血浆半衰期、良好的口服生物利用度、降低的毒性、增加的线粒体能量释放以及改进的制剂特性,例如,由于在水中的溶解度提高所致。

[0029] 在另一方面中,本发明提供了包含化合物1化合物的药物组合物。

[0030] 该药物组合物可以是固体制剂,或它可以是用于使用前重构的固体制剂。

[0031] 或者,它可以是液体形式,如水溶液包括,例如,水性磷酸盐缓冲盐水(PBS)制剂配方的水溶液。通常而,本发明的药物组合物具有至少10%w/w、至少30%w/w、至少50%w/w、至少60%或至少70%w/w的化合物1浓度。在一个实施方式中,该药物组合物是化合物1在纯水中(可选地与血液等渗)的溶液。

[0032] 在另一方面中,本发明提供了化合物1或其组合物在治疗或预防代谢疾病、线粒体功能障碍疾病、线粒体功能障碍相关疾病、线粒体紊乱症、线粒体能量缺乏、药物引起线粒体副作用、癌症、糖尿病、创伤性脑损伤、急性肝损伤和心房颤动中的用途。

[0033] 在一方面中,本发明提供了一种制备包含化合物1的药物组合物的工艺方法。

## 附图说明

[0034] 图1.化合物1批次3的LCMS分析,描述了使用HPLC方法2的吸光度单位(AU)相对于时间的关系。

[0035] 图2.化合物1批次3的LCMS分析,描述了使用HPLC方法2的归一化标度上的总离子计数相对于时间的关系。

[0036] 图3.化合物1批次3的LCMS分析,描述了使用HPLC方法2的强度(%)相对于m/z的关系。

[0037] 图4.化合物1批次12的LCMS分析,描述了使用HPLC方法2的吸光度单位(AU)相对于时间的关系。

[0038] 图5.化合物1批次12的LCMS分析,描述了使用HPLC方法2的归一化标度上的总离子计数相对于时间的关系。

[0039] 图6.化合物1批次12的LCMS分析,描述了使用HPLC方法2的强度(%)相对于m/z的

关系。

[0040] 图7中的A-B.PBS或化合物1在受麻醉猪中的静脉输注,图7中的A中描绘了血浆中琥珀酸酯浓度相对于输注时间的关系,图7中的B中描绘了组织中的富马酸酯浓度。

[0041] 图7中的C.PBS或化合物1在受麻醉猪中的静脉输注,描绘了对血乳酸浓度的影响。

[0042] 图8.PBS或化合物1向同时输注络合物1抑制剂鱼藤酮(rotenone)的受麻醉猪中的静脉输注,图8中的A中描述了输注结束时组织中的琥珀酸酯浓度,图8中的B中描述了脑微透析液中表示为开始输注前的基线值之百分比的乳酸浓度相对于时间的关系。

[0043] 图9.Ndufs4 K0小鼠采用饮用水中的化合物1的治疗,图9中的A中描绘了体重发育相对于时间的关系,而图9中的B中描绘了存活百分比相对于时间的关系。

[0044] 图10.鱼藤酮注射大鼠采用饮用水中的化合物1的治疗,图10中的A中描述了后腿直立(rearings)数相对于治疗的关系,图10中的B中描绘了姿势不稳定性测试中的位移距离相对于治疗的关系,和图10中的C中描绘了血乳酸浓度相对于治疗的关系。

[0045] 图11.化合物1批次12的XRPD分析。

[0046] 图12.化合物1批次15的XRPD分析。

[0047] 图13.化合物1批次3的LCMS分析,描述了使用HPLC方法1的吸光度单位(AU)相对于时间的关系。

[0048] 图14.化合物1批次3的LCMS分析,描述了使用HPLC方法1的归一化标度上的总离子计数相对于时间的关系。

[0049] 图15.化合物1批次3的LCMS分析,描述了使用HPLC方法1的强度(%)相对于m/z的关系。

[0050] 图16.化合物1批次12的LCMS分析,描绘了使用HPLC方法1的吸光度单位(AU)相对于时间的关系。

[0051] 图17.化合物1批次12的LCMS分析,描述了使用HPLC方法1的归一化标度上的总离子计数相对于时间的关系。

[0052] 图18.化合物1批次12的LCMS分析,描述了使用HPLC方法1的强度(%)相对于m/z的关系。

[0053] 图19.化合物1批次3的XRPD分析。

[0054] 图20.化合物1批次18的XRPD分析。

[0055] 图21.化合物1批次13的XRPD分析。

[0056] 图22.化合物1批次14的XRPD分析。

[0057] 图23.化合物1批次19的XRPD分析。

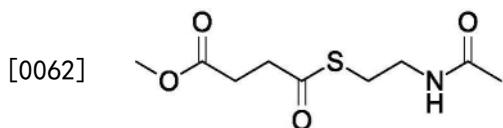
[0058] 图24.化合物1批次16的XRPD分析。

[0059] 图25.化合物1批次17的XRPD分析。

## 具体实施方式

[0060] 在第一方面中,本发明提供了固体形式的分离3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羧基]丙酸甲酯(化合物1)。它可以是游离形式或其盐、水合物、溶剂化物或络合物。

[0061] 化合物1具有结构(式1)：



[0063] 如上所述,化合物1可以是盐的形式。合适的盐包括药用盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、醋酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐等。

[0064] 化合物1也可以是溶剂化物。合适的溶剂化物可以包括水合物、乙醇化物

[0065] 化合物1也可以是络合物的形式。合适的络合物的实例可以是与环糊精、脂质、甘油三酯、碳水化合物、PVA络合的化合物1。

[0066] 在一个实施方式中,所述分离化合物1是具有熔点或熔程范围为约35-约55℃的固体产品。正如根据本文的实施例可以看出,化合物1具有不同的熔点,这很可能取决于化合物1的不同形式的含量,如晶体形式、无定形形式等。具体而言,据已发现,熔点处于39-51℃的范围内,如39℃的熔点和46-51℃范围内,如约46-47℃、48-49℃和50-51℃。

[0067] 在优选的实施方式中,该分离化合物1具有至少80%w/w,如至少85%w/w、至少90%w/w,如至少95%w/w或至少97%w/w的纯度,但它也可以具有较低的纯度,如至少30%w/w、至少40%w/w、至少45%w/w、至少50%w/w、至少55%w/w、至少60%w/w、至少65%w/w、至少70%w/w或至少75%w/w的纯度。取决于生产方法和储存条件,化合物1可以包含晶体和/或它可以包含非晶体,如化合物1的无定形形式,及其混合物。正如由本文的实施例所见,所用的所有方法均产生具有一定结晶度的化合物1。化合物1也可以以粉末形式出现。

[0068] 从本文的实施例中可以看出,化合物1在室温(20-25℃)下具有优异的水溶性。在pH 7.4和实施例中测试的水性介质中,化合物1的水溶性至少为300mg/mL。化合物1的水溶性取决于化合物的结晶度;因此结晶度越低,水溶性越高。正如由本文的实施例10所见,主要无定形的材料可以具有850mg/mL的水溶解度。因此预期化合物1的水溶性处于300-约900mg/mL的范围内。

[0069] 还测定了动力学溶解度并据发现,动力学溶解度的速率常数处于0.005-0.2s<sup>-1</sup>的范围内,如0.01-0.15s<sup>-1</sup>的范围内。动力学溶解度可能取决于各种因素,如粒度、结晶度、无定形物质的含量等。

[0070] 关于化合物1的结晶度,它可以具有0%-100%范围内的结晶度,如10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%。正如从本文的实施例所见,通过本文所述的方法制备的许多批次具有至少50%的结晶度,如处于约50%-约80%的范围内。

[0071] 从实施例中的XRPD数据可以看出,化合物1的晶体的特征在于具有在21.4、22.2、22.8、23.1和23.3(±0.2度,2-θ值)处的信号的X-射线粉末衍射图。

[0072] 化合物1的晶体还可以具有在10.9、13.1、14.9、16.2、20.1、24.0、24.8、26.1处具有一个或多个信号如两个或更多、三个或更多、四个或更多、六个或更多、七个或更多,或八个信号。由实施例中可以看出,几乎所有受试化合物在这些度数(±0.2度,2-θ值)都具有信号。

[0073] 根据实施例中的数据,预期11.1和16.9(±0.2度,2-θ值)处的信号与化合物1的多晶型(形式1)有关。因此,作为上述信号中的一个或多个的补充,或者替代,化合物1的晶体可以具有在11.1和16.9(±0.2度,2-θ值)处具有信号的X-射线粉末衍射图。

[0074] 正如上所述,化合物1是固体形式,特别是包含该化合物的晶体。熔点相当低,但有利的是化合物1不是以油的形式。首先,在药物/药妆组合物的生产中更容易处理化合物1(例如,可磨性、散装粉末流动性和可压缩性)。其次,结晶形式通常是最稳定的形式,而非结晶(不太有序)材料随着时间的推移往往会将形式转变为结晶(更有序,较低能量)。

[0075] 定义:

[0076] 术语“化合物1”表示固体形式的式1化合物并且该术语包括所有结晶形式、所有无定形形式、所有多晶型形式及其混合物,包括相同形式或不同形式的混合物。化合物1也可以是粉末形式。

[0077] 正如本文中关于化合物1所用的术语“纯度”是指化合物1组合物是3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯(化合物1)相对于化合物1和作为副产物、异常形式的化合物1(密切相关结构)和化合物1合成前体相关的杂质的总量的程度。因此,在含有10%w/w化合物1的组合物中,所述化合物1的纯度可以是,例如,95%w/w或50%w/w,这意味着用于制备所述组合物的化合物1分别具有95%w/w或50%w/w的纯度。纯度能够通过多种方法之一进行评价,包括qNMR、HPLC等。在qNMR中,将已知量的分析物溶解于具有已知量内标的NMR溶剂中。获得了<sup>1</sup>H NMR谱,并进行了足够的扫描以降低信噪比。内标和分析物中的示例性共振进行积分。这些积分的比率,再加上知晓信号包含多少质子以及分析物和内标的分子量,随后用于确定纯度(以w/w%表示)。在HPLC中,纯度评价为分析物与具有不同保留时间的其他信号相比的曲线下面积(AUC)。

[0078] 正如本文所用,与化合物1相关的术语“分离的”是指从合成反应中获得并,例如,通过从各种副产物、合成前体和异常化合物1形式中纯化而分离出来的化合物1产品3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯。

[0079] 本文中使用的术语“营养化妆品”是指含有支持生理功能的活性成分,从而随着时间的推移获得更健康、更年轻外观的专门配制以帮助保持皮肤、头发和指甲健康的营养补充剂或化妆品。与外用霜剂或治疗不同,营养化妆品是口服的,从内部发挥作用,从内部促进健康的皮肤、头发或指甲。

[0080] 正如本文所用,术语“药妆品”旨在表示具有据称具有医疗益处的生物活性成分的化妆品。药妆产品作为化妆品销售,但据称至少含有一种生物活性成分。药妆品的实例包括含有如α硫辛酸(lipoic acid)和二甲氨基乙醇等成分的抗皱护肤霜,以及含有“细胞补充精华(cell replenishment serum)”的面霜,这些霜被称为具有“抗衰老特性”。

[0081] 正如本文所用,术语“治疗”旨在表示旨在降低症状严重性或频率的疗法的实施。正如本文所用,术语“治疗”是指治疗性处理和预防性或防护性措施。

[0082] 正如本文所用,术语“预防”旨在表示整体或部分预防,或改善、减少或控制。

[0083] 化合物1一般被W02015/155231的式(I)涵盖,该专利公开了琥珀酸酯和琥珀酸酯前体,它们是细胞可渗透的。然而,随着化合物I的鉴定,本发明人做出了许多新的令人惊讶的发现,这些发现表明,它具有出乎意料的良好特性组合,使其适用于许多治疗和非治疗用途。此外,围绕化合物I的某些形式和制剂的优势已经做出了令人惊讶的发现。

[0084] 本发明化合物的一般用途

[0085] 3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯(化合物1)是本文所述的游离形式或其盐、水合物、溶剂化物或络合物,能够用于医学,特别是用于医学治疗或预防线粒体-相关病

症、疾病或功能障碍,应用于营养化妆品或化妆品中。化合物I还能够用于生产用于此类医学治疗或预防的组合物,或营养化妆品或化妆品。化合物I或其盐、水合物、溶剂化物或络合物能够用于需要增强或重塑能量生产(ATP)的任何情况,如疾病的医学治疗中。医学治疗可以是代谢疾病的治疗,或线粒体功能障碍的疾病或病症的治疗,或与琥珀酸酯水平或琥珀酸酯功能活性降低相关的疾病的治疗,或琥珀酸酯回补效应(anaplerotic effect)或其信令性能是有用时的疾病的治疗,治疗或抑制线粒体疾病。化合物I化合物可以用于刺激线粒体能量生产和重塑药物或化学诱导性线粒体功能障碍,如例如感音神经性听力损失或耳鸣(某些抗生素由于线粒体毒性引起的副作用)、影响线粒体代谢的化学物质或气体的中毒,或乳酸性酸中毒。该化合物可以用于治疗癌症、糖尿病、急性饥饿、内毒素血症、败血症、全身炎症反应综合征、多器官功能障碍综合征并后续缺氧、缺血、中风、心肌梗塞、急性心绞痛、急性肾损伤、冠状动脉闭塞和心房颤动,或避免或抵消再灌注损伤。此外,据设想,本发明的化合物可以有益于治疗男性不育和女性更年期症状。

[0086] 据设想,本发明的化合物I化合物将会提供克雷布氏循环(Kreb's cycle)和可选的糖酵解途径的组分的细胞渗透性前体。据设想,进入细胞后,酶促或化学水解将释放琥珀酸酯。化合物I的这种水解也被认为是特别有利的,因为所释放的硫醇基团具有还原性质。许多疾病都有有害氧化应激组分,这可能会导致细胞结构和细胞功能受损。此外,氧化应激与衰老过程有关。因此,能够充当抗氧化剂并清除自由基或减少氧反应性物质的组分的释放有望在医疗、营养化妆品和美容用途中产生额外的益处。

[0087] 化合物I能够用于增强或恢复线粒体中的能量生产。化合物I还能够用作抗氧化剂并清除自由基或减少氧反应性物质。化合物I能够用于预防或治疗具有与线粒体功能障碍和/或能量(ATP)缺乏相关的组分的障碍或疾病,以及与琥珀酸酯水平或琥珀酸酯功能活性降低相关的疾病,或其中琥珀酸酯的回补效应或其信令特性是有用的疾病。

[0088] 能量生产的增强是,例如,与患有线粒体缺陷、障碍或疾病的受试者相关。线粒体疾病是由线粒体功能障碍引起的,线粒体是除红细胞外的身体每个细胞中存在的专用隔室。当线粒体功能下降时,细胞内产生的能量减少,细胞损伤或细胞死亡会随之而来。

[0089] 线粒体疾病最常出现在非常需要能量的器官中,如视网膜、耳蜗、大脑、心脏、肝脏、骨骼肌、肾脏以及内分泌和呼吸系统。线粒体疾病的症状可能包括运动失控、肌肉无力和疼痛、癫痫发作、视力/听力问题、心脏病、肝病、胃肠道疾病、吞咽困难、疲劳等。线粒体疾病可能是遗传的,也可能是由于自发突变引起,这会导致通常位于线粒体中的蛋白质或RNA分子的功能发生改变。据已发现,许多疾病涉及线粒体缺陷,如络合物I、II、III或IV缺陷或酶缺陷,比如例如丙酮酸脱氢酶缺乏症。然而,情况是复杂的,而许多因素可能与疾病有关。

[0090] 到目前为止,还没有治愈性的治疗方法。唯一可用的治疗方法是能够减轻症状并延缓疾病进展的那些。

[0091] 因此,本发明人的发现和本文所述的发现非常重要,因为它们证明了作为琥珀酸酯前药的可渗透细胞性化合物I对线粒体中的能量生产的有益作用。

[0092] 此外,与已知的琥珀酸酯前药(如,例如,在WO 97/47584中提到)相比,本发明所述的分离化合物I化合物显示出改善的医学治疗特性和用作营养化妆品、营养补充剂、药妆品和化妆品的用途,包括更好的细胞渗透性、更长的血浆半衰期、降低的毒性、增加的能量释放于线粒体以及改进制剂(由于包括溶解度增大的改进特性)。在某些情况下,该分离化合

物1化合物也是口服生物可利用的,这使得给药更容易。

[0093] 因此,本发明的分离化合物的有利特性可以包括以下一种或多种:

[0094] -增加的细胞渗透性

[0095] -增加的口服生物利用度

[0096] -更长的血浆半衰期

[0097] -降低的毒性

[0098] -增加的线粒体能量释放

[0099] -增加的抗氧化活性

[0100] -改进的制剂

[0101] -增大的溶解度

[0102] 本发明提供了适用于药物、作为药物活性物质,特别是用于治疗细胞能量(ATP)缺乏症的化合物1。

[0103] 本发明的化合物可以用于治疗络合物I损伤,该络合物本身的功能障碍或限制NADH向络合物I供给的任何病症或疾病,例如,克雷布斯循环、糖酵解、 $\beta$ -氧化、丙酮酸代谢以及甚至葡萄糖或络合物I相关底物转运的功能障碍。

[0104] 本发明还提供了一种治疗线粒体络合物I相关障碍症如,但不限于,Leigh综合征、Leber遗传性视神经病变(LHON)、MELAS(线粒体脑肌病、乳酸性酸中毒和中风样发作)、线粒体缺失综合征、线粒体肌病和MERRF(红色纤维参差不齐的肌阵挛性癫痫)的方法,该方法包括向有此需要的受试者给药有效量的本发明化合物。

[0105] 本发明还提供了本发明化合物用于制备用于治疗毒素-或药物-诱导乳酸酸中毒/线粒体功能障碍的药物中的用途。

[0106] 分离化合物1还可以用于其中额外能量生产可能有益的任何情况,如但不限于,延长的手术时间和重症监护。

[0107] 线粒体

[0108] 线粒体是真核细胞中的细胞器,通常被称为细胞的“发电厂”。它们的主要功能之一是氧化性的磷酸化。分子三磷酸腺苷(ATP)在细胞中充当能量“货币”或能量载体,而真核细胞从线粒体进行的生化过程中获得其大部分ATP。这些生化过程包括:柠檬酸循环(三羧酸循环或克雷布氏循环),其从氧化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)生成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)并从氧化的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)生成还原的黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH<sub>2</sub>),以及氧化性磷酸化,在此期间NADH和FADH<sub>2</sub>被氧化回到NAD<sup>+</sup>和FAD。

[0109] NADH氧化释放的电子沿着一系列蛋白质络合物(络合物I、络合物II、络合物III和络合物IV)穿梭,被称为电子传输链或呼吸链。琥珀酸酯的氧化发生于络合物II(琥珀酸酯脱氢酶络合物)上,而FAD是络合物琥珀酸酯脱氢酶(络合物II)中的辅基。呼吸络合物嵌入线粒体的内膜中。链末端的络合物IV将电子转移给氧,氧则被还原为水。当这些电子穿过络合物时释放的能量用于线粒体内膜上产生质子梯度,从而产生跨内膜电化学势。另一种蛋白质络合物是络合物V(与络合物I、II、III和IV不直接相关),其利用由电化学梯度储存的能量将ADP转化为ATP。

[0110] 柠檬酸/三羧酸循环和氧化性磷酸化之前是糖酵解,其中一分子葡萄糖分解为两分子丙酮酸,每分子葡萄糖净产生两分子ATP。然后丙酮酸分子进入线粒体,在那里它们通

过氧化性磷酸化而被完全氧化为CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O(整个过程称为有氧呼吸)。除了通过将葡萄糖转化为两个丙酮酸分子产生的2分子ATP之外,两个丙酮酸分子完全氧化成二氧化碳和水还会产生约至少28-29分子ATP。如果没有氧气可用,丙酮酸分子不会进入线粒体,而是在无氧呼吸过程中转化为乳酸。

[0111] 因此,每分子葡萄糖的总净产量为约至少30-31个ATP分子。ATP用于直接或间接地为细胞中的几乎所有其他生化反应提供动力。因此,在有氧呼吸期间由氧化性磷酸化贡献的额外(大约)至少28或29个ATP分子对于细胞的正常功能至关重要。缺氧会阻碍有氧呼吸,并最终会导致几乎所有有氧生物死亡;一些生物体,如酵母,能够通过有氧或无氧呼吸生存。

[0112] 当生物体中的细胞暂时缺氧时,就会利用无氧呼吸,直到再次获得氧气或细胞死亡。糖酵解过程中产生的丙酮酸在无氧呼吸过程中转化为乳酸。乳酸的积聚被认为是在剧烈活动期间肌肉疲劳的原因,此时肌肉细胞无法供氧。当氧气再次变得可用时,乳酸会转化回丙酮酸用于氧化性磷酸化。

[0113] 线粒体功能障碍会导致各种疾病状态。一些线粒体疾病是由于线粒体基因组或细胞核中的突变或缺失。如果细胞中线粒体的阈值比例有缺陷,并且如果组织内此类细胞的阈值比例具有缺陷线粒体,则可能导致组织或器官功能障碍的症状。实际上,任何组织都可能受到影响,并且可能会出现多种症状,取决于不同组织受牵连的程度。

[0114] 本发明化合物的用途

[0115] 本发明的化合物可以用于需要增强或重新储存的能量生产(ATP)的任何情况。实例如是,例如,在所有临床条件下,其中增加线粒体ATP生产或恢复线粒体功能有潜在益处,如与琥珀酸酯水平或琥珀酸酯功能活性降低相关的药物或化学诱导线粒体功能障碍或乳酸酸中毒病症,其中琥珀酸酯回补效应或其信令特性有用的病症的恢复,以及先天性代谢错误、癌症、糖尿病、急性饥饿、内毒素血症、败血症、听力视力下降、全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征的治疗。

[0116] 具体而言,化合物1能够用于医学,特别是用于治疗或预防与线粒体相关的病症、疾病或功能紊乱、用于营养化妆品或化妆品中。

[0117] 线粒体功能障碍也据描述与肾小管酸中毒有关;运动神经元疾病;其他神经系统疾病;癫痫;遗传病;亨廷顿(Huntington)氏病;情绪障碍;精神分裂症;躁郁症;年龄相关疾病;脑血管意外、黄斑部病变;糖尿病;更年期症状和癌症。

[0118] 用于线粒体相关病症或疾病的化合物1

[0119] 本发明的化合物可以用于预防或治疗选自以下的线粒体相关疾病:

[0120] • 衰老

[0121] • Alpers病(进行性婴儿多毛症),

[0122] • 阿尔茨海默氏病

[0123] • 肌萎缩侧索硬化(ALS),

[0124] • 自闭症,

[0125] • Barth综合征(致死性婴儿心肌病),

[0126] • β-氧化缺陷、生物能代谢缺陷、

[0127] • 肉碱-酰基-肉碱缺乏症,

- [0128] • 肉碱缺乏症,
- [0129] • 肌酸缺乏综合征(脑肌酸缺乏综合征(CCCS)包括:氨基乙酸甲基转移酶缺乏症(GAMT缺乏症)、L-精氨酸:甘氨酸肽胺转移酶缺乏症(AGAT缺乏症)和SLC6A8相关肌酸转运蛋白缺乏症(SLC6A8缺乏症)
- [0130] • 辅酶Q10缺乏症,
- [0131] • 络合物I缺乏症(NADH脱氢酶(NADH-CoQ还原酶缺乏症),
- [0132] • 络合物II缺乏症(琥珀酸脱氢酶缺乏症),
- [0133] • 络合物III缺乏症(泛醌-细胞色素c氧化还原酶缺乏症),
- [0134] • 络合物IV缺乏症/COX缺乏症(细胞色素c氧化酶缺乏症是由呼吸链络合物IV缺陷引起),
- [0135] • 络合物V缺乏症(ATP合酶缺乏症),
- [0136] • COX缺乏症、CPEO(慢性进行性外眼肌麻痹综合征)、CPT I缺乏症、
- [0137] • CPT II缺陷,
- [0138] • II型糖尿病,
- [0139] • 弗里德赖希(Friedreich)共济失调(FRDA或FA),
- [0140] • 戊二酸尿症II型,
- [0141] • KSS(卡恩斯-赛尔(Kearns-Sayre)综合症),
- [0142] • 乳酸性酸中毒,
- [0143] • LCAD(长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症),
- [0144] • LC-FAOD(长链脂肪酸氧化障碍)
- [0145] • LCHAD、Leigh病或综合征(亚急性坏死性脑脊髓病),
- [0146] • LHON(莱伯(Leber)遗传性视神经病变),
- [0147] • 勒夫特(Luft)病,
- [0148] • MCAD(中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症),
- [0149] • MELAS(线粒体脑肌病乳酸酸中毒和中风样发作),
- [0150] • MERRF(肌阵挛性癫痫和红纤维参差不齐病(Ragged-Red Fiber Disease)),
- [0151] • 甲基丙二酰辅酶A差向异构酶缺乏症,
- [0152] • 甲基丙二酰辅酶A变位酶缺乏症,
- [0153] • 线粒体DNA耗竭综合征5,
- [0154] • 线粒体DNA耗竭综合征9,
- [0155] • 线粒体DNA耗竭综合征15(肝脑型)(1个家族),
- [0156] • 母体遗传糖尿病和耳聋,
- [0157] • MIRAS(线粒体隐性共济失调综合症),
- [0158] • 线粒体细胞病,
- [0159] • 线粒体DNA耗竭,
- [0160] • 线粒体脑病包括:脑肌病和脑脊髓病、线粒体肌病,
- [0161] • MNGIE(肌神经胃肠道疾病和脑病),
- [0162] • NARP(神经病、共济失调和色素性视网膜炎),
- [0163] • 与帕金森病、阿尔茨海默病或亨廷顿病相关的神经退行性疾病,

- [0164] • 帕金森病
  - [0165] • 皮尔逊(Peatson)综合症,
  - [0166] • 进行性外眼肌麻痹,
  - [0167] • 丙酸血症,
  - [0168] • 丙酮酸脱氢酶缺乏症,
  - [0169] • POLG突变,
  - [0170] • 呼吸链缺陷,
  - [0171] • SCAD(短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症),
  - [0172] • SCHAD和
  - [0173] • VLCAD(极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症)。
- [0174] 特别令人感兴趣的是化合物1在治疗Leigh综合征、LHON、MELAS、MERRF(具有红色纤维参差不齐的肌阵挛性癫痫)和其他与络合物I缺陷相关的疾病/病症中的用途。
- [0175] 本发明化合物在化妆品中的用途
- [0176] 根据本发明的化合物可以用于化妆品中的以下用途:
- [0177] • 改善真皮细胞的代谢功能(老化皮肤)
  - [0178] • 收敛剂(粉刺)
- [0179] 本发明化合物作为营养补充剂的用途
- [0180] 根据本发明的化合物可以用作营养补充剂的以下用途:
- [0181] • 由于剧烈体力活动而增加的能量需求
  - [0182] • 由于感染和手术期间代谢失偿而增加的能量需求
  - [0183] • 通过快速分布到组织和绕过糖酵解而增强肌肉恢复
- [0184] 包含本发明化合物的药物组合物
- [0185] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含本发明所述的分离化合物1化合物以及一种或多种药用稀释剂或载体。
- [0186] 本发明的化合物或其制剂可以通过任何常规方法进行给药,例如,但不限于,它可以经胃肠道给药、口服给药、局部给药(包括粘膜、口腔、舌下、经皮或至皮肤),通过医疗器件给药(例如,支架),通过吸入或通过注射或输注(静脉内、皮下、肌肉内等)。治疗可以由单次剂量或一段时间内的多次剂量组成。
- [0187] 治疗可以通过每天给药一次、每天两次、每天三次、每天四次等。治疗也可以通过连续给药如,例如,静脉滴注给药。
- [0188] 虽然本发明的化合物可以单独给药,但优选将其与一种或多种可接受的载体一起作为药物制剂提供。在与本发明的化合物相容并且对其接受者无害的意义上,载体必须是“可接受的”。合适的载体的例子将在下面更详细地描述。
- [0189] 该制剂可以方便地以剂型例如单位剂型存在并且可以通过药学领域众所周知的任何方法制备。此类方法包括将活性成分(本发明的化合物)与构成一种或多种辅助成分的载体结合的步骤。通常而言,通过将活性成分与液体载体或细碎固体载体或两者均匀且紧密地结合,然后,如果需要,使产品成型而制备制剂。
- [0190] 本发明的化合物通常以包含活性成分的药物制剂形式静脉内、口服或通过任何肠胃外途径给药,可选地以无毒有机或无机、酸或加成盐的形式,以药用剂型进行给药。取决

于待治疗的病症和患者,以及给药途径,该组合物可以不同剂量给药。

[0191] 药物组合物在制造和储存条件下必须稳定;因此,优选将其保存以防止微生物如细菌和真菌的污染作用。根据所选择的制剂类型和给药途径,载体能够是溶剂或分散介质,其包含,例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、植物油和其合适混合物。

[0192] 例如,本发明的化合物还可以以片剂、胶囊剂、丸珠、酏剂、凝胶剂、溶液剂、乳剂或混悬剂的形式口服、含服或舌下给药,其可含有调味剂或着色剂,用于立即、延迟或控释应用。

[0193] 适用于口服给药的本发明制剂可以以离散单位形式呈现,如胶囊、扁囊剂或片剂,每个单位含有预定量的活性成分;作为粉末或颗粒剂;作为水性液体或非水性液体中的溶液剂或悬浮剂;或作为水包油液体乳液剂或油包水液体乳液剂。该活性成分也可以作为丸剂、药糖剂或糊剂提供。

[0194] 适用于口服给药的本发明化合物的溶液剂或悬浮剂还可以含有赋形剂,例如,溶剂如水、乙醇等,N,N-二甲基乙酰胺,分散剂如聚山梨醇酯80、表面活性剂和增溶剂,例如,聚乙二醇、Phosal 50PG(由磷脂酰胆碱、大豆脂肪酸、乙醇、单/二甘油酯、丙二醇和抗坏血酸棕榈酸酯组成)。根据本发明的制剂也可以是乳液的形式,其中化合物1化合物可以存在于油包水或水包油乳液中。油可以是任何油样物质如,例如,大豆油、红花油等,甘油三酯如中链甘油三酯(MCT-油),如例如,椰子油、棕榈油等或其组合。

[0195] 片剂可以含有药用赋形剂,如填充剂、粘合剂、分散剂、崩解剂、助流剂、pH调节剂、稳定剂、掩味剂等。具体实例包括微晶纤维素、乳糖(例如,乳糖单水合物或乳糖任何水合物)、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢钙和甘氨酸、丁酸化羟基甲苯(E321)、交联聚维酮、羟丙基甲基纤维素、崩解剂如淀粉(优选玉米、马铃薯或木薯淀粉)、羟基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复合硅酸盐,以及造粒粘合剂如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、聚乙二醇8000(macrogol 8000)、蔗糖、明胶和阿拉伯树胶。此外,还可以包括润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸、山嵛酸甘油酯和滑石。

[0196] 片剂可以可选地采用一种或多种药用赋形剂通过压缩或模塑制成。压制片剂可以通过在合适的机器中压缩自由流动形式的活性成分如粉末或颗粒,可选地与粘合剂(例如,聚维酮、明胶、羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羟基乙酸淀粉钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂混合而制备。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物而制备。片剂可以可选地被包衣或刻痕并且可以经过配制而提供其中活性成分的缓释或控释,例如,使用不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放曲线。

[0197] 类似类型的固体组合物也可以用作明胶胶囊中的填充剂。在这方面优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、奶糖或高分子量聚乙二醇。对于水性悬浮液和/或酏剂,本发明的化合物可以与各种甜味剂或调味剂、着色物质或染料组合、与乳化剂和/或悬浮剂组合以及与稀释剂如水、乙醇、丙二醇和甘油,及其组合进行组合。

[0198] 适用于口腔局部给药的制剂包括薄膜组合物或锭剂,其包含调味基质的活性成分,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶;惰性基质中含有活性成分的锭剂,如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶;和含有合适液体载体中的活性成分的漱口水。

[0199] 适于局部给药的药物组合物可以配制成软膏、乳膏、悬浮液、乳液、洗剂、粉末剂、溶液、糊剂、凝胶、浸渍敷料、喷雾剂、气溶胶或油、透皮器件、粉剂(dusting powder)等。这些组合物可以通过含有活性剂的常规方法制备。因此,它们还可以包含相容的常规载体和添加剂,如防腐剂、辅助药物渗透的溶剂、乳膏或软膏中的润肤剂以及洗剂中的乙醇或油醇。此类载体可以以组合物的约1%最高至约98%的形式存在。更常见的是,它们将形成最高达约80%的组合物。仅作为说明,通过混合足量的亲水性材料和水而制备乳膏或软膏,其中含有约5wt % - 10wt %的化合物,其量足以产生具有所需稠度的乳膏或软膏。

[0200] 适用于经皮给药的药物组合物可以作为旨在与接受者的表皮长时间保持密切接触的离散贴剂呈现。例如,活性剂可以通过离子电渗疗法从贴剂递送。

[0201] 为了应用于外部组织,例如,口腔和皮肤,该组合物优选作为局部软膏或乳膏应用。当配制成软膏时,该活性剂可以与石蜡或与水混溶的软膏基质一起使用。

[0202] 或者,该活性剂可以配制成为具有水包油乳膏基质或油包水基质的乳膏。

[0203] 对于肠胃外给药,使用活性成分和无菌载体制备流体单位剂型或输注剂,例如,但不限于,水、醇、多元醇、甘油和植物油,优选水。取决于所使用的载体和浓度,该活性成分可以是胶体的,悬浮或溶解于载体中。在制备溶液时,能够将活性成分溶解于注射用水中并,例如,通过过滤灭菌进行灭菌之后装入合适的小瓶或安瓿并密封。

[0204] 有利的是,能够将诸如局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂的药剂溶解于载体中。为了提高稳定性,该组合物能够在填充到小瓶中并在真空下除去水之后通过冷冻干燥而冷冻。然后将干燥的冻干粉末密封于小瓶中并且可以提供伴随的注射用水小瓶以在使用前重构液体。

[0205] 适用于注射用途的本发明药物组合物包括无菌水溶液或分散液。此外,该组合物能够是用于临时制备这种无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末形式。在所有情况下,最终的可注射形式必须是无菌的,并且必须是有效的流体以便于注射。

[0206] 本发明的药物组合物包括适用于眼内给药的制剂。这些由治疗有效量的化合物1、一种或多种药用赋形剂或药用载体组成。这种药物组合物可以是常规剂型的滴眼剂或具有更好生物利用度的其他组合物。此类克服眼部药物递送障碍并具有改善的眼部生物利用度的组合物是,例如,乳液、软膏、悬浮液、水性凝胶、纳米胶束、纳米颗粒、脂质体、树枝状聚合物、纳米悬浮液、微针和原位热敏凝胶。

[0207] 肠胃外悬浮液的制备方式与溶液基本相同,不同之处在于活性成分悬浮与载体中而不是溶解,并且不能通过过滤实现灭菌。活性成分可以在悬浮于无菌载体中之前通过暴露于环氧乙烷进行灭菌。有利的是,该组合物中包含表面活性剂或润湿剂以促进活性成分的均匀分布。

[0208] 由本文的实施例中可以看出,应该避免含有碳酸盐的赋形剂,特别是在液体或半固体制剂中。优选碳酸盐浓度应该低于0.85mM。

[0209] 应当理解的是,除了上面特别提到的成分之外,本发明的制剂可以包括本领域常规的其他试剂,考虑到所讨论的制剂类型,例如,那些适合口服给药的制剂可以包括调味剂。本领域技术人员将知道如何选择合适的制剂以及如何制备它(参见,例如,《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》18版或后续版本)。本领域技术人员也将知道如何选择合适的给药途径和剂量。

[0210] 本发明提供了一种制备根据前述权利要求中任一项所述的液体药物组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0211] a) 获得游离形式或其盐、水合物、溶剂化物或络合物形式的3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯(化合物1),

[0212] b) 可选地加热至低于90°C,如60°C或保持于室温

[0213] c) 添加水性液体(例如,pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水)、盐水溶液或纯水

[0214] d) 可选地通过超声处理辅助溶解

[0215] e) 室温混合

[0216] 从而获得所述药物组合物。

[0217] 本领域技术人员将认识到,本发明化合物的个体剂量的最佳量和间隔将由所治疗病症的性质和程度、给药形式、途径和部位,以及接受治疗的特定受试者的年龄和体况决定,以及医生将最终确定要使用的适当剂量。通常该剂量可以酌情重复。如果出现副作用,根据正常的临床实践,可以改变或减少剂量的用量和/或频率。

[0218] 除非上下文另有要求,本文提及的所有%值都是%w/w。

[0219] 包含本发明化合物的营养化妆品组合物

[0220] 营养化妆品是口服给药产品。本发明还提供包含化合物1化合物的营养化妆品组合物。营养化妆品组合物包含游离形式的化合物1或其盐、水合物、溶剂化物或络合物以及一种或多种口服可接受的稀释剂或载体。营养化妆品组合物是非常相似的口服给药的药物组合物。

[0221] 因此,典型的组合物是片剂、胶囊剂、丸剂、酏剂、凝胶剂、溶液剂或悬浮剂。

[0222] 包含本发明化合物的药妆组合物

[0223] 药妆组合物通常给药于皮肤或粘膜。有时它们也可以通过注射给药。本发明还提供包含化合物1化合物的药妆组合物。药妆组合物包含游离形式的化合物1或其盐、水合物、溶剂化物或络合物以及一种或多种口服可接受的稀释剂或载体。

[0224] 典型的药妆组合物包括上文提到的那些适用于皮肤、适用于粘膜或通过注射给药的组合物。

[0225] 本发明的其他方面

[0226] 本发明还提供如上文定义的式(I)化合物或其药用形式与一种或多种独立选自以下的药剂的组合(例如,用于治疗线粒体功能障碍):

[0227] • 酮衍生物,例如,泛醌(Ubiquinone)、艾地苯醌(Idebenone)、MitoQ

[0228] • 维生素,例如,生育酚、生育三烯酚和Trolox(维生素E)、抗坏血酸(C)、硫胺素(B1)、核黄素(B2)、烟酰胺(B3)、甲萘醌(K3),

[0229] • 除维生素外的抗氧化剂,例如,TPP-化合物(MitoQ)、Sk-化合物、表儿茶素、儿茶素、硫辛酸、尿酸、褪黑激素

[0230] • 二氯乙酸盐

[0231] • 亚甲基蓝

[0232] • L-精氨酸

[0233] • Szeto-Schiller肽、艾拉米啶(elamipretide)和艾拉米啶类似物

[0234] • 肌酸

- [0235] • 苯二氮草类
- [0236] • PGC-1 $\alpha$ 调节剂
- [0237] • AMPK调节剂
- [0238] • 线粒体裂变和融合调节剂
- [0239] • PPAR $\alpha/\beta/\gamma$ -激动剂
- [0240] • Trolox类似物、甲酰胺衍生物
- [0241] • Nrf-2活化剂
- [0242] • NAD $^+$ 调节剂
- [0243] • NAD $^+$ 前体
- [0244] • 生酮饮食

[0245] 本发明的另一方面是本文公开的任何化合物1化合物可以与任何其他化合物如,例如,碳酸氢钠(作为丸剂(例如,1mEq/kg),然后连续输注)作为本文公开的化合物的伴随药物一起给药。

[0246] 由于线粒体氧化性磷酸化的络合物I相关损伤导致的乳酸酸中毒或药物诱导副作用

[0247] 本发明还涉及预防或治疗乳酸性酸中毒和线粒体相关药物引起副作用。具体而言,根据本发明的化合物1化合物用于预防或治疗络合物I处或上游的线粒体相关药物或毒素诱导副作用,或以其他方式表达,本发明会提供根据本发明用于预防或治疗对络合物I的药物诱导直接抑制或任何限制NADH向络合物I供给的药物诱导效应(例如,但不限于,对克雷布斯循环、糖酵解、 $\beta$ -氧化、丙酮酸代谢以及甚至影响葡萄糖或其他络合物I相关底物的转运或水平的药物的影响)。

[0248] 药物引起的线粒体毒性可能是所需治疗效果的一部分(例如,癌症药物引起的线粒体毒性),但在大多数情况下,药物引起的线粒体毒性是有害作用。线粒体毒性能够显著增加糖酵解,以补偿氧化性磷酸化导致的线粒体ATP形成的细胞损失。这会导致血浆乳酸水平升高,其如果过多会导致乳酸性酸中毒,这可能是致命性的。A型乳酸酸中毒主要与组织缺氧有关,而B型有氧乳酸酸中毒与药物、毒素或全身性疾病有关,如肝病、糖尿病、癌症和先天性代谢错误(例如,线粒体遗传缺陷)。

[0249] 许多已知的药物物质对线粒体呼吸产生负面影响(例如,抗精神病药、局部麻醉药和抗糖尿病药)而因此,需要确定或开发能够用于规避或减轻通过使用这种药物物质引起的负面线粒体效应的手段。此外,一些化学试剂和气体会对线粒体代谢和功能产生负面影响。

[0250] 本发明提供了用于预防或治疗乳酸性酸中毒和线粒体相关药物或毒素诱导副作用的化合物1化合物。具体而言,琥珀酸酯前药用于预防或治疗在络合物I处或上游的线粒体相关的药物诱导副作用,或以其他方式表达,本发明提供琥珀酸酯前药用于预防或治疗络合物I、其他呼吸络合物的药物-诱导直接抑制或任何限制NADH向络合物I供应的药物诱导效应(例如,但不限于,对克雷布斯循环、糖酵解、 $\beta$ -氧化、丙酮酸代谢和甚至影响葡萄糖或其他络合物I相关底物的转运或水平的药物)。

[0251] 正如上所述,在采用可能具有线粒体相关副作用的药物治疗的患者中经常会观察到乳酸血浆水平升高。本发明基于实验结果证实,二甲双胍(2型糖尿病的一线治疗药物,并

且与作为一种罕见副作用的乳酸性酸中毒有关)在络合物I处以二甲双胍中毒相关的浓度按照时间和剂量依赖性方式抑制人外周血细胞的线粒体功能。随着时间的推移,二甲双胍进一步引起完整血小板的乳酸生成显著增加。

[0252] 因此,本发明提供了用于预防或治疗乳酸性酸中毒的根据式(I)的化合物。然而,由于本文报道的结果是基于与络合物I的直接抑制相关或与络合物I处或上游的缺陷相关的乳酸酸中毒,因此据设想,根据本发明的化合物适用于在络合物I处或上游预防或治疗与线粒体相关的药物诱导副作用。根据本发明的化合物还将会抵消破坏络合物I上游代谢的药物作用(间接抑制络合物I,这将会涵盖任何限制向络合物I供给NADH的药物作用,例如,对克雷布斯循环、糖酵解、 $\beta$ -氧化、丙酮酸代谢以及甚至影响葡萄糖或其他络合物I相关底物的水平的药物的作用)。这些化合物还可以通过增加质子移动动力(motive force)而抵消络合物I下游(络合物III、IV和V)的缺陷。

[0253] 据设想,化合物1能够用于工业应用,例如,在体外减少或抑制乳酸的形成或增加商业或工业细胞系的ATP可用度。实例包括用于细胞培养、器官保存等。

[0254] 根据本发明的化合物用于治疗或预防药物诱导的线粒体相关副作用,或用于治疗中增加或恢复细胞能量(ATP)或琥珀酸酯的水平。具体而言,它们用于治疗或预防直接或间接药物诱导的络合物I线粒体相关副作用。具体而言,它们用于治疗或预防乳酸性酸中毒,如由药物物质引起的乳酸性酸中毒。

[0255] 本发明还涉及化合物1与可诱发线粒体相关副作用,特别是由药物物质直接或间接损害络合物I引起的副作用的药物物质的组合。此类组合能够用作线粒体相关副作用的预防性防护,或在副作用出现的情况下用于减轻和/或治疗线粒体相关副作用。

[0256] 据设想,化合物1将会有效治疗或预防药物诱发副作用,特别是与直接或间接抑制络合物I相关的副作用。

[0257] 已知会引起络合物I缺陷、功能障碍或损伤和/或已知具有乳酸性酸中毒副作用的药物有:

- [0258] 镇痛药,包括对乙酰氨基酚、辣椒素(capsaicin)
- [0259] 抗心绞痛药,包括胺碘酮(amiodarone)、哌克昔林(perhexiline)
- [0260] 抗生素,包括利奈唑胺、曲伐沙星、庆大霉素
- [0261] 抗癌药,包括包含丝裂霉素C、阿霉素的醌类
- [0262] 抗惊厥药,包括丙戊酸
- [0263] 抗糖尿病药,包括二甲双胍、苯乙双胍、丁基双胍、曲格列酮和罗格列酮、吡格列酮
- [0264] 抗B型肝炎,包括氟尿苷(fialuridine)
- [0265] 抗组胺药
- [0266] 抗帕金森病,包括托卡朋(tolcapone)
- [0267] 抗精神病药,利培酮,
- [0268] 抗精神分裂症,佐替平、氯氮平
- [0269] 抗菌剂,季铵化合物(QAC)
- [0270] 抗结核药,包括异烟肼
- [0271] 贝特(Fibrate)类,包括氯贝特、环丙贝特、辛伐他汀
- [0272] 催眠药,包括丙泊酚

- [0273] 免疫抑制疾病缓解抗风湿药(DMARD),来氟米特(Leflunomide)
- [0274] 局部麻醉剂,包括布比卡因(bupivacaine)、双氯芬酸、吲哚美辛(indomethacin)和利多卡因(lidocaine)
- [0275] 肌肉松弛剂,包括丹曲林(dantrolene)
- [0276] 抗精神病药,包括抗精神病药,如氯丙嗪、氟奋乃静和卤哌啶醇
- [0277] NRTI(核苷酸逆转录酶抑制剂),包括依法韦仑、替诺福韦、恩曲他滨、齐多夫定、拉米夫定、利匹韦林、阿巴卡韦、去羟肌苷(didanosine)
- [0278] 非甾体抗炎药(NSAID),包括尼美疏醚(nimesulide)、甲芬那酸、舒林酸(sulindac)
- [0279] 巴比妥酸。
- [0280] 已知具有乳酸性酸中毒副作用的其他药物包括 $\beta$ 2-激动剂、肾上腺素、茶碱(theophylline)或其他除草剂。醇类和可卡因也能够导致乳酸性酸中毒。
- [0281] 此外,据设想,本发明的化合物也可以有效治疗或预防即使其与络合物I缺陷无关的乳酸性酸中毒。
- [0282] 药物和本发明化合物的组合
- [0283] 本发明还涉及用于治疗和/或预防选自乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或障碍相关的副作用的药物诱发副作用的药物和本发明化合物的组合,其中
- [0284] i) 该药物适用于治疗该药物指定的疾病,和
- [0285] ii) 本发明的化合物适用于预防或减轻由该药物诱发或可诱发的副作用,其中所述副作用选自乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍相关的副作用。
- [0286] 这种药物与本发明的任何化合物的任何组合都属于本发明的范围内。因此,基于本文的公开内容,本领域技术人员将会理解的是,本发明的主旨是本发明化合物避免或减少本文所述的副作用的有价值的性质的发现。因此,根据本公开显而易见的是,能够进入细胞并递送琥珀酸酯和可能的其他活性部分的本发明化合物与具有或可能具有本文所述副作用的任何药物进行组合的潜在用途。
- [0287] 本发明还涉及
- [0288] i) 包含药物和本发明化合物的组合物,其中所述药物具有选自乳酸酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍相关的副作用的潜在药物诱导副作用,
- [0289] ii) 如上文i)所述的组合物,其中本发明的化合物适用于预防或减轻由所述药物诱发或可诱发的副作用,其中所述副作用选自乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍有关的副作用。
- [0290] 该组合物可以采用两个独立包装的形式:
- [0291] 第一包装包含所述药物或包含所述药物的组合物,而第二包装包含本发明的化合物1化合物或包含本发明的所述化合物的组合物。该组合物也可以是包含所述药物和本发明的化合物1化合物的单一组合物。
- [0292] 在该组合物包含两个单独包装的情况下,所述药物和本发明的化合物1化合物可以通过不同的给药途径给药(例如,通过口服给药所述药物,而通过肠胃外或粘膜给药的本发明的化合物)和/或它们可以基本上同时给药,或所述药物可以在本发明的化合物之前给药,反之亦然。

[0293] 试剂盒

[0294] 本发明还提供了一种试剂盒,其包括

[0295] i) 包含所述药物的第一容器,该药物具有选自乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍相关的副作用的潜在药物诱发副作用,和

[0296] ii) 包含本发明化合物1化合物的第二个容器,该化合物具有预防或减轻所述药物诱发或可诱发副作用的潜力,其中所述副作用选自乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍有关的副作用。

[0297] 治疗/预防副作用的方法

[0298] 本发明还涉及治疗患有选自乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍相关的副作用的药物诱导副作用的受试者的方法,该方法包括向受试者给药有效量的本发明化合物1化合物,以及涉及预防或减轻药物诱导副作用的方法,所述副作用选自受试者的乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍相关的副作用,该受试者患有采用可能诱发选自乳酸性酸中毒和与络合物I缺陷、抑制或功能障碍相关的副作用的副作用的药物治疗的疾病,该方法包括在采用所述药物治疗之前、期间或之后向所述受试者给药有效量的本发明的化合物1化合物。

[0299] 二甲双胍

[0300] 二甲双胍是属于双胍类的抗糖尿病药物。它是2型糖尿病(占美国糖尿病病例的90%左右)的一线疗法。抗糖尿病作用归因于减少肝脏葡萄糖的产生,通过增加外周组织对葡萄糖的摄取和减少肠道对葡萄糖的摄取而增加胰岛素的生物效应,但确切的作用机制尚未彻底阐明。尽管它比其他抗糖尿病药有优势,但它与作为副作用的罕见乳酸酸中毒(LA)病例有关。LA定义为阴离子间隙增加、动脉血乳酸水平高于5mM且pH值≤7.35。

[0301] 以下非限制性实施方式的列表进一步举例说明本发明:

[0302] 1. 分离的3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯(化合物1),是游离形式或其盐、水合物、溶剂化物或络合物。

[0303] 2. 根据实施方式1所述的分离的化合物1,其是固体产品。

[0304] 3. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其是或包含结晶产品,如具有化合物1批次12的XRPD图(图7)或具有化合物1批次15的XRPD图(图8),或具有是11.2(±0.2)和16.9(±0.2)的位置(°2θ)的多晶型物。

[0305] 4. 根据实施方式1-2中任一个所述的分离的化合物1,其是或包含无定形产品。

[0306] 5. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其具有至少20%w/w、至少30%w/w、至少40%w/w、至少50%w/w、在至少60%w/w、至少70%w/w、至少75%w/w、至少80%w/w、至少90%w/w、至少95%w/w、至少97%w/w、至少98%w/w或至少99%w/w的纯度。

[0307] 6. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其具有低于75%w/w、低于70%w/w、低于65%w/w、低于60%w/w、低于55%w/w、低于50%w/w、低于45%w/w、低于40%w/w、低于35%w/w、低于30%w/w、低于25%w/w、低于20%w/w、低于15%w/w、低于10%w/w、低于5%w/w、低于3%w/w、低于2%w/w或低于1%w/w的相关杂质含量。

[0308] 7. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其具有小于50%w/w、小于40%w/w、小于30%w/w、小于25%w/w、小于20%w/w、小于15%w/w、小于10%w/w、小于5%w/w、低于3%w/w、低于2%w/w,或小于1%w/w的合成前体含量。

- [0309] 8. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其具有足以用于药物用途的纯度。
- [0310] 9. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其是游离形式。
- [0311] 10. 根据实施方式1-8中任一个所述的分离的化合物1,其是盐。
- [0312] 11. 根据实施方式10所述的分离的化合物1,其是盐酸盐、氢溴酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、马来酸盐或丙二酸盐。
- [0313] 12. 根据实施方式1-8中任一个所述的分离的化合物1,其是水合物,如一水合物。
- [0314] 13. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其适用于人或动物。
- [0315] 14. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其适用于人。
- [0316] 15. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其适用于医药。
- [0317] 16. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其适用作药物产品中的活性药物成分。
- [0318] 17. 根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1,其适用于治疗或预防代谢疾病、线粒体功能障碍疾病、线粒体功能障碍相关疾病、线粒体障碍症、线粒体能量缺乏症、药物引起线粒体副作用、癌症、糖尿病、脑外伤、心脏骤停缺氧、缺血、中风、心肌梗塞、急性心绞痛、急性肝损伤、冠状动脉闭塞、心房颤动、男性不育和女性更年期症状。
- [0319] 18. 根据实施方式17所述的分离的化合物1,其中所述线粒体功能障碍疾病或与线粒体功能障碍相关的疾病选自
- [0320] 衰老
- [0321] Alpers病(进行性婴儿多毛症),
- [0322] 阿尔茨海默氏病,
- [0323] 肌萎缩侧索硬化(ALS)自闭症,
- [0324] Barth综合征(致死性婴儿心肌病),
- [0325]  $\beta$ -氧化缺陷,生物能代谢缺陷,
- [0326] 肉碱-酰基-肉碱缺乏症,
- [0327] 肉碱缺乏症,
- [0328] 肌酸缺乏综合症(脑肌酸缺乏综合症(CCCD),包括:胍基乙酸甲基转移酶缺乏症(GAMT缺乏症)、L-精氨酸:甘氨酸肽转移酶缺乏症(AGAT缺乏症)和SLC6A8相关肌酸转运蛋白缺乏症(SLC6A8缺乏症)
- [0329] 辅酶Q10缺乏症,
- [0330] 络合物I缺乏症(NADH脱氢酶(NADH-CoQ还原酶缺乏症),
- [0331] 络合物II缺乏症(琥珀酸脱氢酶缺乏症),
- [0332] 络合物III缺乏症(泛醌-细胞色素c氧化还原酶缺乏症),
- [0333] 络合物IV缺乏症/COX缺乏症(细胞色素c氧化酶缺乏症是由呼吸链络合物IV缺陷引起),
- [0334] 络合物V缺乏症(ATP合酶缺乏症),
- [0335] COX缺乏症、CPEO(慢性进行性外眼肌麻痹综合征),
- [0336] CPT I缺乏症,
- [0337] CPT II缺乏症,

- [0338] II型糖尿病,
- [0339] 弗里德赖希共济失调(FRDA或FA),
- [0340] 戊二酸尿症II型,
- [0341] KSS(卡恩斯-赛尔综合征),
- [0342] 乳酸性酸中毒,
- [0343] LCAD(长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症),
- [0344] LC-FAOD(长链脂肪酸氧化病)
- [0345] LCHAD,Leigh病或综合征(亚急性坏死性脑脊髓病),
- [0346] LHON(莱伯遗传性视神经病变),
- [0347] 勒夫特病,
- [0348] MCAD(中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症),
- [0349] MELAS(线粒体脑肌病乳酸酸中毒和中风样发作),
- [0350] MERRF(肌阵挛性癫痫和红纤维参差不齐病),
- [0351] 甲基丙二酰辅酶A差向异构酶缺乏症,
- [0352] 甲基丙二酰辅酶A变位酶缺乏症,
- [0353] 线粒体DNA耗竭综合征5,
- [0354] 线粒体DNA耗竭综合征9,
- [0355] 线粒体DNA耗竭综合征15(肝脑型)(1个家族),
- [0356] 母体遗传性糖尿病和耳聋,
- [0357] MIRAS(线粒体隐性共济失调综合症),
- [0358] 线粒体细胞病,
- [0359] 线粒体DNA耗竭,
- [0360] 线粒体脑病包括:脑肌病和脑脊髓病、线粒体肌病、
- [0361] MNGIE(肌神经胃肠道紊乱病和脑病),
- [0362] NARP(神经病、共济失调和色素性视网膜炎),
- [0363] 与帕金森病、阿尔茨海默病或亨廷顿病相关的神经退行性疾病,
- [0364] 皮尔逊综合症,
- [0365] 帕金森病
- [0366] 进行性外眼肌麻痹,
- [0367] 丙酸血症,
- [0368] 丙酮酸脱氢酶缺乏症,
- [0369] POLG突变,
- [0370] 呼吸链缺陷,
- [0371] SCAD(短链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症),
- [0372] SCHAD,
- [0373] VLCAD(极长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症)。
- [0374] 19.根据实施方式18所述的分离的化合物1,其中所述线粒体功能障碍疾病或与线粒体功能障碍相关的疾病归因于络合物I功能障碍并且选自Leigh综合征、Leber遗传性视神经病变(LHON)、MELAS(线粒体脑肌病、乳酸性酸中毒和中风样发作)和MERRF(肌阵挛性癫

痫,伴有红纤维参差不齐)。

[0375] 20.根据实施方式1-17中任一个所述的分离的化合物1,适用于治疗或预防代谢功能障碍。

[0376] 21.根据实施方式20所述的分离的化合物1,其中所述代谢功能障碍是糖尿病,如胰岛素分泌缺陷(2型糖尿病)。

[0377] 22.根据实施方式20所述的分离的化合物1,其中所述代谢功能障碍是药物诱导型线粒体副作用。

[0378] 23.根据实施方式22所述的分离的化合物1,其中所述药物诱导型线粒体副作用选自二甲双胍诱导的络合物I抑制(乳酸性酸中毒)、扑热息痛/对乙酰氨基酚诱导的络合物I抑制(肝衰竭)或药物诱导的线粒体耗竭。

[0379] 24.根据实施方式20所述的分离的化合物1,其中所述代谢功能障碍是化学诱导型线粒体副作用。

[0380] 25.根据实施方式24所述的分离的化合物1,其中所述化学诱导型线粒体副作用选自鱼藤酮抑制络合物I(帕金森样症状)、农药诱导抑制呼吸络合物和线粒体酶、化学战剂诱导抑制呼吸络合物和线粒体酶以及呼吸络合物和线粒体酶的气体中毒,例如,一氧化碳中毒。

[0381] 26.根据实施方式20所述的分离的化合物1,其中所述代谢功能障碍是遗传性线粒体功能障碍。

[0382] 27.根据实施方式26所述的分离的化合物1,其中所述遗传性线粒体功能障碍选自由于线粒体数量减少导致的能量生产功能障碍、线粒体转录因子功能障碍、核DNA编码线粒体蛋白(有助于大线粒体DNA(mtDNA)-蛋白质络合物稳定的线粒体膜蛋白,称为核素)转录因子功能障碍、能量生产功能障碍、丙酮酸脱氢酶缺乏、络合物I、II、III或IV缺乏或酶缺乏如,例如,丙酮酸脱氢酶缺乏症,参与琥珀酸酯合成的酶(例如,丙酰辅酶A羧化酶、甲基丙二酰辅酶A变位酶和琥珀酰辅酶A合成酶)功能障碍。

[0383] 28.根据实施方式27所述的分离的化合物1,其中所述有效量是每天1mg-5.0g、每天10mg-2.0g、每天25mg-1g、每天50mg-500mg、每天100mg-1000mg、每天250mg-1000mg或每天50mg-500mg的化合物1或其盐、水合物、溶剂化物或络合物。

[0384] 29.根据实施方式15-28中任一个所述的分离的化合物1,其中所述化合物1或其盐、水合物、溶剂化物或络合物以每天一次至每天10次,或每天一次到每天4次向所述受试者进行给药。

[0385] 30.根据实施方式15-29中任一个所述的分离的化合物1,其中所述治疗或预防是预治疗,例如,在手术前使用,在有高代谢需求的计划医疗干预之前使用,以及在受试者进入战区或其他危险环境之前使用。

[0386] 31.根据实施方式15-30中任一个所述的分离的化合物1,其中所述治疗或预防是长期治疗。

[0387] 32.根据实施方式1-14中任一个所述的分离的化合物1,适用于人或动物的非药物用途。

[0388] 33.根据实施方式19所述的分离的化合物1,适用作药妆品或营养化妆品。

[0389] 34.根据实施方式28-29中任一个所述的分离的化合物1,适用作能量饮料或乳膏。

- [0390] 35. 包含根据前述实施方式中任一个所述的分离的化合物1的组合物。
- [0391] 36. 包含根据实施方式1-14中任一个所述的分离的化合物1的药妆品。
- [0392] 37. 包含根据实施方式1-14中任一个所述的分离的化合物1的营养化妆品。
- [0393] 38. 包含根据实施方式1-14中任一个所述的分离的化合物1的能量饮料。
- [0394] 39. 包含根据实施方式1-33中任一个所述的分离的化合物1的药物组合物。
- [0395] 40. 一种制备根据实施方式1-33中任一个所述的分离的化合物1的方法,所述方法包括以下步骤:
  - [0396] a) 在偶联剂的存在下,在0-100°C下,使N-乙酰半胱胺和琥珀酸单甲酯在有机溶剂中进行反应,
  - [0397] b) 分离化合物1,
  - [0398] 从而提供分离的化合物1。
- [0399] 41. 根据实施方式40所述的方法,其中步骤a)在独立地溶剂是二氯甲烷而偶联剂是羰基二咪唑且温度为15-30°C的情况下进行。
- [0400] 42. 根据实施方式40-41中任一个所述的方法,其中步骤b)包括用酸性水溶液(可选地20%氯化铵)萃取,并随后用另一种水性介质(合适的盐水或水)萃取有机层。
- [0401] 43. 根据实施方式42所述的方法,其中在真空中除去有机层并且将残余物溶解于具有适合结晶溶解特性的有机溶剂中,如甲基-叔丁基醚(MTBE)。
- [0402] 44. 根据实施方式42所述的方法,其中将所述溶液冷却,合适地冷却至约5°C并加入抗溶剂,如正庚烷,在搅拌一段时间,适当地约24小时之后,通过过滤收获化合物1并用抗溶剂洗涤。
- [0403] 45. 根据实施方式1-3中任一个所述的分离的化合物1,其中位置( $^{\circ}2\theta$ )是11.2(±0.2)和16.9(±0.2)。
- [0404] 46. 一种根据实施方式39所述的药物组合物,其是固体制剂。
- [0405] 47. 根据实施方式46所述的药物组合物,其是用于在使用前重构的固体制剂。
- [0406] 48. 根据实施方式46所述的药物组合物,其是水性制剂。
- [0407] 49. 根据实施方式48所述的药物组合物,其是磷酸盐缓冲盐水(PBS)水溶液制剂。
- [0408] 50. 根据实施方式46-49中任一个所述的药物组合物,其具有至少10%w/w、至少30%w/w、至少50%w/w、至少60%w/w或至少70%w/w的化合物1浓度。
- [0409] 51. 根据实施方式46-50中任一个所述的药物组合物,其适用于口服给药、皮下给药、静脉内给药、肠胃外给药、眼部给药或局部给药。
- [0410] 52. 根据实施方式51所述的药物组合物,其是饮料或凝胶。
- [0411] 53. 根据实施方式46-52中任一个所述的药物组合物,其包含1mg-5.0g、10mg-2.0g、25mg-1g、50mg-500mg、100mg-1000mg、250mg-1000mg、或50mg-500mg的化合物1或其盐、水合物、溶剂化物或络合物。
- [0412] 54. 根据实施方式46-53中任一个所述的药物组合物,其是立即释放制剂。
- [0413] 实施例
- [0414] 通用方法、材料和测试。
- [0415] 纯度分析的HPLC方法。
- [0416] HPLC法1

- [0417] 溶剂A是水+0.1%NH<sub>4</sub>OH

[0418] 溶剂B是2.5L乙腈+130mL H<sub>2</sub>O+0.1%NH<sub>4</sub>OH

[0419] 梯度:T=0min,B%=5,流速=1mL/min;T=0.1min,B%=5,流速=1mL/min;T=9.5min,B%=95,流速=1mL/min;T=10.2min,B%=95,流速=1mL/min;T=10.3min,B%=95,流速=1.5mL/min;T=11.1min,B%=95,流速=1.5mL/min;T=11.15min,B%=5,流速=1.5mL/min;T=11.5min,B%=5,流速=1.5mL/min;

[0420] 色谱柱是Waters XSelect CSH C18 3.5μm,2.1mm×50mm。

[0421] 吸光度在二极管阵列检测器上234nm处监测。

[0422] 样品浓度1mg/mL,进样量1 μL

[0423] HPLC法2

[0424] 溶剂A是水+1.57g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>+5mL甲酸

[0425] 溶剂B是2.5L乙腈+130mL H<sub>2</sub>O+4.5mL甲酸

[0426] 梯度:T=0min,B%=0,流速=1mL/min;T=1min,B%=0,流速=1mL/min;T=9.5min,B%=20,流速=1mL/min;T=10.3min,B%=95,流速=1mL/min;T=10.5min,B%=95,流速=1.5mL/min;T=11.0min,B%=95,流速=1.5mL/min;T=11.05min,B%=0,流速=1.5mL/min;T=11.5min,B%=0,流速=1.5mL/min;

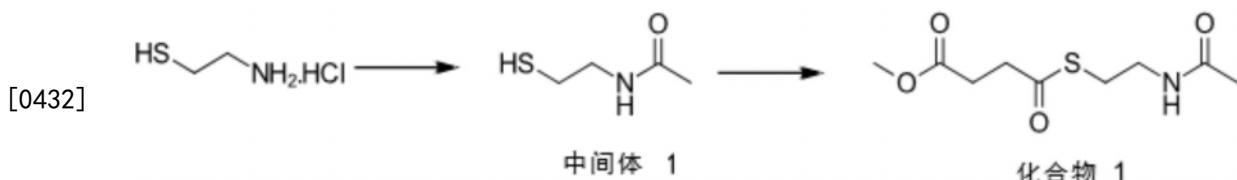
[0427] 色谱柱是Waters XSelect CSH C18 3.5μm,2.1mm×50mm。

[0428] 吸光度在二极管阵列检测器上230nm处监测。

[0429] 样品浓度1mg/mL,进样量1 μL

[0430] 实施例1 3-[(2-乙酰氨基乙硫基)羰基]丙酸甲酯(化合物1)的合成。

[0431] 化合物1合成和分离的详细描述:



- [0433] 化合物1通过三种单独的方法(以下A、B和C)制备。

[0434] 方法A

[0435] 向2-氨基乙硫醇盐酸盐(226g,2mol)、KOH(114g,2mol)和NaHCO<sub>3</sub>(168g,2mol)的水(4L)溶液中逐滴加入乙酸酐(204g,2mol)。混合物在室温下搅拌45min。反应混合物用EtOAc(8×2L)萃取,经MgSO<sub>4</sub>干燥并在减压下除去溶剂而得到呈淡黄色油状的中间体1(190g,80%产率)。

[0436] 向4-甲氧基-4-氧代丁酸(209g,1.583mol)和HOBT(214g,1.583mol)的二氯甲烷(4L)溶液中加入N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(304g,1.583mol)。混合物在室温下搅拌2小时。滴加中间体1(189g,1.583mol)。混合物在室温下搅拌2小时。滴加三乙胺(160g,1.583mol)。混合物在室温下搅拌过夜。所得混合物用水(2L)和NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液(2×2L)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并在减压下浓缩而提供呈黄色油状的粗化合物1(350g)。通过硅胶柱色谱法(2000g硅胶,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=100/1-80/1洗脱)纯化粗化合物1,得到呈白色固体的化合物1(201g,94.9%在LCMS中)。通过硅胶柱色谱法(1200g硅胶,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=100/1-80/1洗脱)纯化来自纯化的粗侧馏分(110g),得到化合物1(40g,96.7%在LCMS),为

白色固体。

[0437] 方法B

[0438] 室温下将乙酸酐(7.14g, 0.07mol)滴加到2-氨基乙硫醇盐酸盐(11.3g, 0.1mol)、KOH(5.6g, 0.1mol)和NaHCO<sub>3</sub>(5.88g, 0.07mol)的水(200mL)溶液中。混合物在室温下搅拌45min。反应混合物用EtOAc(8×200mL)萃取, 经MgSO<sub>4</sub>(1h)干燥, 然后在50℃下真空除去溶剂, 而得到粗中间体1(7g, 84%产率), 为淡黄色液体。

[0439] 将1,1'-羰基二咪唑(11.34g, 0.07mol)分批加入4-甲氧基-4-氧代丁酸(9.24g, 0.07mol)的二氯甲烷(200mL)溶液中。混合物在室温下搅拌1小时。滴加中间体1(7g, 0.059mol), 然后室温搅拌混合物3小时。将所得混合物用HCl(1N, 3×150mL)和NaHCO<sub>3</sub>饱和溶液(3×150mL)洗涤, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1h)干燥, 然后在50℃下真空除去溶剂, 得到9.5g黄色固体的化合物1。

[0440] 方法C

[0441] 向KOH(0.71kg, 13.2mol)和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.00kg, 9.43mol)在水(15L)中的溶液中加入2-氨基乙硫醇盐酸盐(1.5kg, 13.2mol)。在+22℃下将乙酸酐(0.96kg, 9.43mol)逐滴添加到所得澄清的深紫色溶液中, 在添加期间保持内部温度低于+30℃(添加时间为24min)。将反应混合物在+20℃下搅拌1小时35min。加入二氯甲烷(23L)并将混合物在+28±2℃下搅拌20min。分层。水相用二氯甲烷(2×15L)萃取, 在萃取期间将内部温度调节至+28±2℃。合并有机相, 真空除去溶剂。然后中间体1在+40℃下真空干燥18小时。产量为996g, 纯度>97面积% (GC)。获得呈棕色油状的粗中间体1。

[0442] 蒸馏: 在以下条件下使用薄层蒸馏单元蒸馏933g中间体1: T=+110℃, P=1mbar, 速率=202g/h。获得透明无色油状的中间体1。

[0443] 向4-甲氧基-4-氧代丁酸(1.33kg, 10.07mol)的DCM(10L)溶液中分批加入1,1'-羰基二咪唑(CDI)(1.63kg, 10.07mol)。在添加期间观察到剧烈的发泡和气体逸出。添加完成后, 将混合物在+20至+25℃下搅拌1小时。加入中间体1(1.00kg, 8.39mol)的二氯甲烷(5L)溶液, 保持内部温度低于+30℃。将反应混合物在+20至+25℃下搅拌2小时。加入20% NH<sub>4</sub>Cl水溶液(10L)并将混合物搅拌20min。分层。有机相依次用13% NaCl水溶液和水(分别为10L和5L)萃取。然后通过蒸馏将溶剂(DCM)变为MTBE。将化合物1的MTBE溶液(约6L)逐渐冷却至+5℃。当内部温度达到+12℃时开始结晶。向浆液中加入正庚烷(15L), 并将混合物在0至+5℃下搅拌20小时(过夜)。过滤浆液, 滤饼用正庚烷(2×3L)洗涤。通过抽吸空气通过它42小时而干燥产品。产量为1.26kg(64%), 纯度为98.5面积-% (HPLC)。

[0444] 通过上述合成制备了几批化合物1。各批次通过不同的纯化方法进行纯化, 如方法A、B和C中所述。

[0445] 批次3(或化合物1-s3)通过方法A制备。

[0446] 批次12(或化合物1-s12)、13(或化合物1-s13)和14(或化合物1-s14)通过方法B制备。

[0447] 批次15(或化合物1-s15)、16和17通过方法C制备。

[0448] 实施例2-不同批次化合物1的表征。

批次编号	生成方法	XRPD 数据	XRPD 结晶度
2	方法 A		
3	方法 A	图 19	<b>74.4%</b>
4	方法 A		
5	方法 B		
6	方法 B		
11	方法 A 然后通过方法 B 纯化		
12	方法 B	图 11	
13	方法 B	图 21	<b>70.2%</b>
14	方法 B	图 22	<b>56.2%</b>
15	方法 C	图 12	
16	方法 C	图 24	<b>65.2%</b>
17	方法 C 然后通过制备-HPLC 和冻干纯化	图 25	<b>63.7%</b>
18 (储存的批次 12)	批次 12, -20°C 下以固体储存 20 个月	图 20	<b>70.4%</b>
19 (储存的批次 15)	批次 15, -20°C 下以固体储存 14 个月	图 23	<b>69.7%</b>

[0450] 应该提到的是,在XRPD分析期间温度会升高。由于化合物1具有低熔点(并且据设想,无定形形式具有比结晶形式更低的熔点),上表中给出的结晶度可以被视为最小值。

[0451] 批次3

[0452] 在TGA分析中,批次3在20-150°C的温度下具有0.04wt %的损失。图1-图3显示了批次3的LCMS分析光谱。批次3的熔点为50.4°C,这由差示扫描量热法(DSC)确定。

[0453] 批次12

[0454] 批次12通过与上述批次3的分析所用相同的方法进行分析。

[0455] 在20-150°C的温度下,TGA分析的损失为0.12wt %。LCMS的结果如图4-图6所示,qNMR纯度为96.1%,熔点为48.6°C。

[0456] 批次13

[0457] 批次13的分析方法与上述批次的分析所用方法相同。

[0458] 在20-150°C的温度下,TGA分析的损失为0.18wt %。未显示LCMS谱,但结果汇总于表5中。qNMR纯度为96.3%,熔点为49.0°C。

[0459] 批次14

[0460] 批次14通过与用于分析上述批次所用相同的方法进行分析。

[0461] 在20-150°C的温度下,TGA分析的损失为0.45wt %。未显示LCMS谱,但结果汇总于表5中。qNMR纯度为91.6%,熔点为46.9°C。

[0462] 批次15

[0463] 批次15通过与分析上述批次所用的一些相同方法进行分析。

[0464] LCMS谱未显示,但结果汇总于表5中。qNMR纯度为98.9%,熔点为39°C。

[0465] 批次特性的比较:批次3、12、13、14、15和16

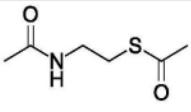
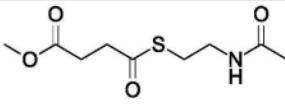
[0466] 表5还总结了固体化合物1的纯度、熔点和目视描述。固体化合物1批次表现为白色、自由流动粉末,参见表5。

[0467] 此外,表5显示所制备的化合物1批次的溶解度均为至少366-398mg/mL,并且此类制剂在水中的外观从视觉上表现为清澈透明或半透明溶液。

[0468] 表5.不同批次化合物1的分析结果汇总。

	批次 3	批次 12	批次 13	批次 14	批次 15	批次 16
[0469]	最终纯化方法 通过硅胶柱色谱法纯化	通过硅胶柱色谱法纯化 洗涤、干燥并去除溶剂	洗涤、干燥并去除溶剂	洗涤、干燥并去除溶剂	洗涤、沉淀并干燥	洗涤、沉淀并干燥
	通过高 pH HPLC 的纯度 (%)	99.1	97.7	96.7	99.3	98.5
	98.1	96.1	96.3	91.7	98.9	95.6
[0470]	熔点 (°C)	50.4	48.6	49.0	46.9	39
	形式的视觉描述 白色、自由流动粉末;有些“结块”的物料	大白色蜡状块状物;有些白色、自由流动粉末	大白色蜡状块状物;有些白色、自由流动粉末	大白色蜡状块状物;有些白色、自由流动粉末	白色,自由流动粉末	白色,自由流动粉末
	400 mg 化合物在 0.7 mL 水中,实测浓度 (mg/mL)	381	378	395	366	414
	435					
	水中制剂的视觉描述 无色透明溶液	浑浊半透明溶液	无色透明溶液	无色透明溶液	无色透明溶液	无色透明溶液

[0471] 表6.化合物1批次重新纯度和杂质的分析总结(LCMS2高pH杂质曲线)。

[0472]	RT(min)	0.69	1.57	1.86	2.18	2.22	6.24
	RRT(min)	0.439	1.000	1.185	1.389	1.414	3.975
	表观分子量	161.0	233.0	319.9	247.0	305.0	278.0
	结构(由 m/z 推导)			TBC	TBC	TBC	TBC
	%@234nm, 批次 3	0.52	99.14		0.35		
	%@234nm, 批次 12		97.65	1.41	0.24	0.38	0.32

[0473]	%@234nm, 批次 13	0.47	96.71	2.44	0.39		
	%@234nm, 批次 14	0.34	99.34	0.32			

[0474] 实施例3-化合物1的水性制剂制备。

[0475] 配制方案

[0476] 1. 称出所需量的化合物1, 然后将所需量的赋形剂(0.9% w/v盐水、100mM PBS pH 7.4, 水)加入固体化合物1中, 得到所需mg/mL浓度的化合物1。例如, 对于化合物1在水中的400mg/mL制剂, 称出400mg化合物1并加入0.7mL水。

[0477] 2. 将溶液超声10min, 然后摇动20min以确保化合物1完全溶解。

[0478] 3. 如果需要, 可以将溶液离心(13000rpm, 10min)以去除任何颗粒物。

[0479] 4. 如果需要, 可以对溶液进行无菌过滤。

[0480] 表7. 根据上述方案制备的不同批次化合物1的水中制剂的数据

样品	目标浓度 (mg/mL)	进样量 ( $\mu$ L)	稀释因 子	计算浓度 (mg/mL)	纯度 (%)
批次 3, 自来水中	400	2	1000	381	98.8
批次 12, 自来水中	400	2	1000	378	99.2
批次 13, 自来水中	400	2	1000	395	99.1
批次 14, 自来水中	400	2	1000	366	99.4

[0482] 制剂50% w/v

[0483] 在PBS中以50% w/v配制四个批次的化合物1。

[0484] 将~500mg化合物称重到小瓶中, 加入~500 $\mu$ L 100mM PBS pH 7.4, 将小瓶超声10min, 然后振摇20min。随后取出样品, 按1/2000稀释并通过HPLC分析计算浓度。

[0485] 表8. 在pH 7.4的PBS中制备化合物1制剂。通过HPLC测量可溶性制剂中化合物1的

浓度。

样品	所加化合物1的量 (mg)	所加 100 mM PBS pH 7.4 的量 (μL)	通过 HPLC 计算的浓度, (mg/mL)
批次 3	525	525	535
批次 4	514	514	526
批次 5	494	494	531
批次 6	481	481	543

[0487] 化合物1液体制剂

[0488] 将化合物1批次3在烘箱中加热至60°C长达20min,此时它变成半透明的淡黄色液体。添加100mM PBS pH 7.4(20% v/v)并将溶液在振荡器上混合20min。此后,溶液冷却至室温并保持为半透明液体。将溶液在4°C下放置72小时。此后的观察证实它仍然是半透明液体。

[0489] 制剂总结

[0490] 化合物1能够在水溶液如0.9% w/v盐水、100mM PBS pH 7.4或水中配制的量似乎没有可达到的限制。这可能能够通过化合物1的熔点进行解释,在几个批次中熔点测量值为约47-50°C。当将水溶液加入固体中时,它会破坏化合物1分子的分子内相互作用,使其与水混溶。

[0491] 实施例4-凝胶制剂

[0492] 将化合物1配制成2.25mg/mL的凝胶包。

[0493] 实验细节

[0494] 取出一个HydroGel凝胶包(清洁H<sub>2</sub>O水凝胶,8盎司袋装,HydroGel,Portland,ME)并分装入用于不同的实验的falcon管。

[0495] 首先,使用蓝色食用染料观察水溶液混合入凝胶的难易程度。取两个凝胶样品,一个保持于室温,另一个在微波中熔化(1min)。加入蓝色食用染料(1% v/v)并混合溶液。当凝胶熔化时,混合会更加有效。混合<10秒后,染料能够完全掺入。

[0496] 接着,将染料溶液替换为化合物1的溶液。

[0497] 将水加入化合物1(225mg/mL,100×所需浓度)并超声处理20min,然后振摇30min。取样进行HPLC分析以检查浓度。

[0498] 表9.化合物1在水原液中的测量浓度

样品	预期浓度 (mg/mL)	进样量 (μL)	稀释因子	计算浓度 mg/mL	纯度 (%)
加入凝胶的水原液	225	1	100	222.749	98.8

[0500] 该分析表明化合物1已完全溶解。

[0501] 将另外两份凝胶熔化,加入化合物1水溶液(1% v/v)。将凝胶摇动与加入染料时相同的时间长度(10秒)。让凝胶凝固。

[0502] 一旦凝胶凝固,取样用于HPLC分析以检查化合物1是否均匀分布。

[0503] 取样方案

- [0504] 1. 将凝胶样品(100mg)加入Eppendorf中并加入MeOH(0.9mL,1/10稀释)
- [0505] 2. 样品在摇床(vibrax)上摇动30min
- [0506] 3. 样品离心(13000rpm,10min)
- [0507] 4. 取上清液进行HPLC分析
- [0508] 表10. 凝胶样品中化合物1的实测浓度。

[0509]	样 品	预期浓度 (mg/mL)	进样量 ( $\mu$ L)	稀释因 子	计算浓 度 mg/mL	纯度 (%)
	4°C	2.25	5	10	2.07	99.4
	37°C	2.25	5	10	2.03	99.5

- [0510] 化合物1的浓度略低于预期的2.25mg/mL,但两个样品非常吻合,这表明化合物1分布均匀,稀释因子略有出入。
- [0511] 一个凝胶样品保持于RT(室温)下,另一个保持于4°C下,以测试凝胶中化合物1的稳定性。
- [0512] 凝胶制剂的稳定性
- [0513] 如上在规则时间点对凝胶取样,以检查4°C和RT下的稳定性。来自这些实验的数据显示于表11-12中。
- [0514] 表11. 4°C下储存超过20天的凝胶样品中的化合物1浓度。

[0515]	时 间 (天数)	预期浓度 (mg/mL)	进样量 ( $\mu$ L)	稀释 因子	计算浓度 mg/mL	AUC (T=0 时的%)	纯度 @230 nm (%)
	0	2.25	5	10	2.071	100.0	99.4
	1	2.25	5	10	2.024	97.8	99.4
	5	2.25	5	10	1.937	93.5	99.4
	7	2.25	5	10	1.979	95.6	99.4
	11	2.25	5	10	2.007	96.9	99.4
	14	2.25	5	10	2.167	104.7	99.4
	20	2.25	5	10	2.218	107.1	99.5

- [0516] 表12. 室温(约20°C)下储存超过20天的凝胶样品中的化合物1浓度

[0517]	时 间 (天数)	预期浓度 (mg/mL)	进样量 ( $\mu$ L)	稀释 因子	计算浓度 mg/mL	AUC (T=0 时的%)	纯度 @230 nm (%)
	0	2.25	5	10	2.034	100.0	99.5
	1	2.25	5	10	1.746	85.8	99.5
	5	2.25	5	10	2.053	100.9	99.4
	7	2.25	5	10	1.721	84.6	99.2
	11	2.25	5	10	1.889	92.9	99.1
	14	2.25	5	10	2.739	134.6	99.4
	20	2.25	5	10	2.273	111.7	99.4

- [0518] 数据的总体趋势,尤其是230nm纯度数据表明化合物1在凝胶制剂中稳定至少20天。由于用于提取的凝胶样品称重不准确以及凝胶中化合物1的局部浓度可能存在差异,因

此AUC数据具有更大的误差。

[0519] 凝胶制剂的制备方案

[0520] 制备化合物1在水中的100倍浓缩溶液,以使将其能够以凝胶体积的1/100添加到凝胶中。所给出的例子是在200mL凝胶包中的最终浓度为2.25mg/mL,因此需要2mL 100×化合物1的水溶液(225mg/mL)。还据建议,将食用染料添加到原液中,并将合并的溶液注入凝胶包(前提是它不会对研究造成不利影响)。这给出了化合物1溶液已均匀分布于凝胶中的目视检查。如果含有食用染料,建议对照组凝胶中也加入食用染料。

[0521] 1. 称取500mg化合物1放入3mL小瓶(或类似物)中

[0522] 2. 加水2mL(加2mL水到500mg化合物1中,占该固体化合物1的体积,并经HPLC校准曲线确认为225mg/mL),超声20min,然后摇晃30min(溶液可能会保持轻微混浊)。添加1mL天然食用染料(食用染料将有助于揭示已实现均匀分布)。

[0523] 3. 如有必要,此溶液能够进行无菌过滤

[0524] 4. 将未开封凝胶包浸入70°C的水中加热10min,并凝胶将变成流动液体

[0525] 5. 将化合物1溶液吸入针头/注射器(有/无食用染料)

[0526] 6. 用针在凝胶袋上刺一个小孔而将化合物1溶液(和食用染料)注射到凝胶袋中

[0527] 7. 用胶带将凝胶袋注射部位重新密封

[0528] 8. 用力摇晃凝胶包5min,使化合物1均匀分布(如果包含食用染料,则当注入的溶液通过凝胶颜色变化而均匀分布时会变得显而易见)

[0529] 9. 让凝胶凝固,这在室温下要花费约45min

[0530] 10. 使用凝胶或在4°C密封保存(建议凝胶开封后4°C保存最多14天)

[0531] 11. 在4°C和室温下化合物1在凝胶中稳定至少14天

[0532] 试验方案

[0533] 根据所述方案制备凝胶制剂,并且HPLC分析表明在水原液和凝胶制剂中达到了正确的化合物1浓度。

[0534] 表13. 水原液和凝胶制剂的化合物1浓度

样品	预期浓度 (mg/mL)	进样量 ( $\mu$ L)	稀释因子	计算浓度 mg/mL	纯度 @230 nm (%)
[0535] 添加至凝胶 中水原液					
	225	2	200	229.496	99.0
凝胶制剂	2.25	5	10	2.355	99.7

[0536] 将2mL水原液加入1mL食用染料中。将其稀释并通过HPLC分析。用食用染料稀释的水原液的AUC是稀释前水原液的0.63倍,表明化合物1在用食用染料稀释时保持可溶。

[0537] 结果/结论

[0538] 化合物1能够以2.25mg/mL的浓度配制于水性凝胶包中,并且在4°C和RT下均稳定至少20天。

[0539] 实施例5-化合物1的盐水制剂

[0540] 1. 称取400mg化合物1并加入0.7mL盐水中(0.9% w/v)

[0541] 2. 超声20min,然后摇动30min或直到所有化合物目视溶解

[0542] 化合物1冻/融稳定性

[0543] 方法:

[0544] 1. 将盐水 (0.9% w/v) 添加到化合物1中 (1mg/mL), 然后超声处理10min直至完全溶解

[0545] 2. 取样进行HPLC分析 (F/T 0)

[0546] 3. 溶液在-80°C下冷冻过夜。

[0547] 4. 解冻溶液, 取样进行HPLC分析 (F/T 1)

[0548] 5. 步骤3&4重复3个循环

[0549] 表14. 冻/融 (FT) 循环后化合物1的纯度

样品	FT 循环	预期浓度 (mg/mL)	进样量 (μL)	稀释因子	计算浓度 mg/mL	纯度 (%)
[0550] 盐水中的化合物1	0	1	2	1	1.157	98.9
	1	1	2	1	1.148	98.8
	2	1	2	1	1.153	98.9
	3	1	2	1	1.146	98.8

[0551] 结果(表14)表明, 化合物1在盐水中的分析测试或纯度没有显著变化, 因此化合物1在至少3个冷冻/解冻循环中是稳定的。

[0552] 化合物1RT稳定性

[0553] 方法:

[0554] 1. 将盐水 (0.9% w/v) 添加到化合物1中 (1mg/mL), 然后超声处理10min直至完全溶解

[0555] 2. 取样进行HPLC分析 (T=0)

[0556] 3. 溶液室温保存

[0557] 4. 定期取样进行HPLC稳定性分析

[0558] 结果:

[0559] 结果表明, 化合物1在盐水中的测试或纯度没有显著变化(数据未描述), 因此化合物1在室温下稳定至少14天。

[0560] 化合物1的200-500mg/mL制剂

[0561] 方法:

[0562] 1. 将盐水 (0.9% w/v) 加入不同量的化合物1批次11中, 然后超声处理10min—样品保持轻微混浊

[0563] 2. 样品摇晃30min, 此时溶液变为半透明

[0564] 3. 将溶液稀释进行HPLC分析

[0565] 结果:

[0566] 表15. 在盐水溶液中渐增浓度下化合物1的纯度。

样品	RT (min)	进样量 ( $\mu$ L)	稀释 因子	计算浓度 mg/mL	纯 度 (%)
400 mg 化合物 1 在 1 mL 盐水中	8.21	5	1000	261	98.7
400 mg 化合物 1 在 0.7 mL 盐水中					
400 mg 化合物在 0.4 mL 盐水中					

[0567] [0568] 结果显示(表15)盐水溶液中化合物1能够达到超过500mg/mL。

[0569] 转移方案 (400mg/mL制剂)

[0570] 3. 称取400mg化合物1批次11并添加0.7mL盐水 (0.9% w/v)

[0571] 4. 超声20min,然后摇动30min或直到所有化合物目视溶解

[0572] 结果/结论

[0573] 化合物1冻/融稳定性

[0574] 化合物1在至少3个冻/融循环中是稳定的。

[0575] 化合物1RT稳定性

[0576] 化合物1在室温下稳定至少14天(数据收集待继续)。

[0577] 化合物1的400mg/mL制剂

[0578] 化合物1在盐水中能够达到超过500mg/mL。

[0579] 实施例6-化合物1在水和DMSO中的稳定性

[0580] 将化合物1分别以1mg/mL的浓度溶解于水和DMSO中,并在室温、37°C和65°C下储存保持40天的稳定性。

[0581] 表16. 室温下黑暗中的化合物1水溶液(浓度1mg/mL)和纯度测量

时间 (天数)	AUC@230 nm	AUC (%) , T=0)	纯度 @230 nm (%)	LCMS 纯度 (%)
0	9041	100.0	100.0	100.0
1	8847	97.9	100.0	99.2
2	8807	97.4	100.0	98.3
4	8045	89.0	100.0	99.0
7	8588	95.0	100.0	99.2
11	8554	94.6	100.0	98.7
14	8662	95.8	100.0	95.6
17	8873	98.1	100.0	98.1
23	8561	94.7	100.0	98.9
38	8555	94.6	100.0	98.7

[0583] 在室温下,在38天的时间内,在水中的化合物1中观察到纯度和测试中少量损失。

[0584] 表17. 化合物1在37°C黑暗中的水中(浓度1mg/mL)和纯度测量

时间 (天数)	AUC@230 nm	AUC (% , T=0)	纯度 @230 nm (%)	LCMS 纯度 (%)
[0585]	0	9044	100.0	100.0
	1	9798	108.3	99.6
	2	8681	96.0	97.5
	4	8156	90.2	99.0
	7	9106	100.7	98.9
	11	8577	94.8	98.4
	14	7777	86.0	96.9
[0586]	17	7928	87.7	93.2
	23	7567	83.7	98.4
	38	7579	83.8	98.3

[0587] 在38天的时间里,化合物1在37℃的水中发现纯度和测试损失。测试损失比在室温下在水中观察到的损失更显著。

[0588] 表18.化合物1在65℃黑暗中的水中(浓度1mg/mL)和纯度测量

时间(天)	AUC@230 nm	AUC (% , T=0)	纯度 @230 nm (%)	LCMS 纯度 (%)
[0589]	0	8741	100.0	100.0
	1	8614	98.5	98.3
	2	8410	96.2	97.3
	5	7512	85.9	95.9
	8	8750	100.1	99.1
	14	9095	104.0	99.0
	29	4521	50.0	89.1

[0590] 在29天的时间内,在水中的化合物1中注意到纯度和测试下降。纯度和测试损失比在37℃的水中观察到的损失更显著。

[0591] 表19.化合物1的DMSO溶液在37℃下黑暗中(浓度1mg/mL)和纯度测量

时间 (天数)	AUC @230 nm	AUC(% , T=0)	纯度@230 nm (%)	LCMS 纯度 (%)
[0592]	0	16363	100.0	98.4
	1	17465	106.7	98.4
	4	17041	104.1	98.2
	8	17644	107.8	98.2
	11	17434	106.5	99.0
	14	17557	107.3	98.2
	22	17353	106.1	98.0
	37	17904	109.4	97.6

[0593] 在37天的时间里,在37℃的化合物1的DMSO中,发现纯度或测试没有显著损失。

[0594] 表20.化合物1在DMSO中在65℃下黑暗中(浓度1mg/mL)和纯度测量

时间(天)	AUC@230	AUC (% ,	纯度 @230 nm	LCMS 纯 度
-------	---------	----------	------------	----------

数)	nm	T=0)	(%)	(%)
[0596]	0	15834	100.0	98.1
	1	16974	107.2	98.3
	2	16185	102.2	96.8
	5	17175	108.5	99.2
	8	14415	91.0	96.7
	14	13846	87.4	93.9
	29	16472	100.7	97.7

[0597] 在29天的时间里,在65°C的化合物1的DMSO中发现纯度或测试没有明显损失。

[0598] 实施例7-化合物1的分析

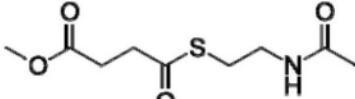
[0599] 通过XRPD分析来自实施例1的方法C(批次15)的材料。数据显示于图12中并且显示晶体材料。

[0600] 方法A(批次12)的材料也通过XRPD进行分析,并且似乎显示出具有相同多晶型的晶体材料(图11)。

[0601] 实施例8-化合物1与其他琥珀酸酯前药的溶解度比较

[0602] 与其他琥珀酸酯前药相比,化合物1在水性制剂中的溶解度通过将固体材料溶解于水性制剂中并通过HPLC(-MS)测量溶液中的量而进行评价。据观察,化合物1在水中溶解度超过350mg/mL,PBS(pH 7.4)溶解度为190mg/mL,0.9%盐水中溶解度超过500mg/mL,而所评价的其他琥珀酸酯前药的溶解度要低得多。在许多情况下,其他前药的最大溶解度低于100μM。参见表21例如,其他琥珀酸酯前药在PBS pH 7.4中的溶解度数据。

[0603] 表21:实施例琥珀酸酯前药的溶解度

测试制品	溶解度 (μM)
[0604]	 化合物 1
	>>100 (参见文本)
A	52

[0605] 实施例9-化合物1与其他琥珀酸酯前药的生物利用度比较

[0606] 使用标准caco-2体外生物利用度测定法(简而言之,汇合Caco-2细胞(L 1,A.P.,1992;Grass,G.M.;,et al.,1992,Volpe,D.A.,et al.,2001)在由In Vitro Technologies Inc.(IVT Inc.,Balti-more,Md.,USA)提供的24孔Corning Costar Transwell格式测定口服化合物1的生物利用度的细胞渗透和潜力。尖室含有0.15mL Hank's平衡缓冲溶液(HBBS)pH 7.4,1%DMSO,0.1mM荧光黄。底室含有0.6mL HBBS pH 7.4,1%DMSO。对照和测试在37°C的加湿培养箱中孵育,以130rpm振荡1小时。荧光黄仅通过细胞旁(紧密连接之间)途径渗透,荧光黄的高表观渗透率( $P_{app}$ )表明分析测试期间细胞受损,并且所有这些孔都被拒斥。普萘洛尔(Propranolol)(良好被动渗透,没有已知的转运蛋白效应)和醋丁洛尔(acebutalol)(通过P-糖蛋白主动外排减弱的被动渗透不良)用作参考化合物。通过向尖室

或底室(0.01mM)施加化合物,以单向和双向形式测试化合物。尖室或底室中的化合物通过HPLC-MS进行分析。结果表示为与其他琥珀酸酯前药相比的表观渗透率,  $P_{app}$ , (nm/s), 包括来自W02015/155231的数字。数据显示于下表22中,表明化合物1的尖室至底室侧转移最高,表明细胞渗透性和生物利用度改善。体内药代动力学研究证实了这一点,与其他测试的前药不同,该研究表明化合物1还具有高口服生物利用度,并且是脑渗透性的。

[0607] 表22. 化合物1与其他琥珀酸酯前药相比的Caco-2生物利用度

化合物 ID	$P_{app}$ (A-B) nm/s
化合物 1	4.12
A	3.13
B	1.92

[0609]	C		1.28
	D		1.42
	E		<0.21
	F		1.45
	G		0.87
	HI		2.62
	J		1.35
	K		1.68
	L		0.16
	M		0.97

[0610] 实施例10-化合物1不同批次的热力学溶解度比较

[0611] 产生了具有不同结晶度的两批化合物1。批次2的结晶度高于批次3,这被认为具有更高程度的非晶化合物1-批次2,因此被视为结晶度更高的批次,而批次3被视为更无定形的批次。本文档中讨论了所使用的方法。PBS照常规生成 (NaCl (8g/L)、KC1 (0.2g/L)、无水磷酸氢二钠 (1.42g/L) 和无水磷酸二氢钾 (0.24g/L) 加入到250mL去离子水,搅拌混合物直至所有固体溶解)。根据需要使用HCl (1M) 或NaOH (1M) 将溶液的pH调节至pH 7.4。

[0612] 将更无定形的化合物1批次3的样品加入PBS或水中至终浓度为258mg/mL并超声处理10min,然后振摇30min。离心去除固体物质后,分析表明浓度已达到258mg/mL。

[0613] 将结晶度更高的化合物1批次2的样品添加到HPLC级水(Fisher)中至最终浓度为30mg/mL并超声处理10min,然后振摇30min。离心去除固体物质后,分析表明浓度已达到17mg/mL。

[0614] 将结晶度更高的化合物1批次2的样品加入HPLC级水(Fisher)中至终浓度为52mg/mL并超声处理20min,然后振摇1小时。离心去除固体物质后,分析表明已达到52mg/mL的浓度。

[0615] 从所提供的数据中能够看出一更无定形的材料比更高结晶度的材料具有更高的动力学溶解度。

[0616] 将结晶度更高的化合物1批次2的样品加入HPLC级水(Fisher)中至终浓度2000mg/mL并超声处理20min,然后振摇1.5小时。离心去除固体物质后,分析表明浓度已达到850mg/mL。该结果表明,结晶度更高的化合物的水溶性为至少850mg/mL,即它具有高水溶性,但对于更无定形的化合物1,其动力学溶解度更高。

[0617] 实施例11-化合物1在纯化水或非纯化水中的稳定性比较

[0618] 建立化合物1在“纯化”HPLC级水(Fisher Scientific)和“非纯化”自来水中稳定性的并行实验。简而言之,化合物1的1mg/mL溶液是在“纯化”的HPLC级水(Fisher Scientific)和“未纯化的”自来水中生成。这些在室温下培养长达10天。化合物1的浓度和纯度随时间通过HPLC进行评价,与标准品比较(计算浓度为8.21RT峰@230nm的AUC和用于纯度分析的化合物1峰相对于杂质的AUC)。所提供的数据是两个样品的平均值。

[0619] 表23:化合物1批次3以1mg/mL溶解于自来水中,在室温下储存表中注明的天数

[0620]	时间(天数)	预期浓度(mg/mL)	计算浓度(mg/mL)	纯度(%)
0	1	1.06	98.5	
3	1	0.98	95.7	
5	1	0.93	94.4	
6	1	0.89	93.3	
10	1	0.83	93.0	

[0621] 表24:化合物1批次3溶解于HPLC级水(Fisher Scientific)中,浓度为1mg/mL,室温下储存的天数列于表中

[0622]	时间(天数)	预期浓度(mg/mL)	计算浓度(mg/mL)	纯度(%)
0	1	1.02	99.0	
3	1	1.04	98.8	
5	1	1.03	99.0	
6	1	1.01	99.0	

[0623] 在室温下储存6天后,溶解于(未纯化的)自来水中样品中观察到化合物1显著降解,正如纯度和测试的损失所见。对于溶解于(纯化)HPLC级水(Fisher Scientific)中的样品,没有观察到这种情况。对于化合物1不同批次的两个独立样品也观察到了类似的数据。

[0624] 实施例12-化合物1的HP-环糊精制剂

[0625] 赋形剂制备

[0626] 将Kleptose羟丙基 $\beta$ -环糊精(25%w/v)、无水磷酸二氢钠(0.048%w/v)、磷酸氢二钠二水合物(0.295%w/v)和EDTA钙二钠(0.5%w/v)加入100mL去离子水中。将混合物超声处理20min,然后搅拌直至所有固体溶解,然后用HCl(1M)将pH值调节至7.4。

[0627] 配制方案

[0628] 1.称出所需量的化合物1,然后将所需量的所制备赋形剂加入固体化合物1中,而得到所需mg/mL浓度的化合物1(所测试的最大值25mg/mL)。例如,对于化合物1的20mg/mL制剂,称出20mg化合物1并加入1mL所制备的赋形剂。

[0629] 2.将溶液超声10min,并随后摇动20min以确保化合物1完全溶解。

[0630] 3.如果需要,可以将溶液离心(13000rpm,10min)以去除任何颗粒。

[0631] 4.如果需要,能够对溶液进行无菌过滤。

[0632] 实施例13-化合物1的输注递送琥珀酸酯,增加猪的琥珀酸酯代谢并降低血乳酸浓度

[0633] 化合物1的输注增加了血浆琥珀酸酯水平,增加组织中琥珀酸酯向富马酸酯的代谢并降低血乳酸浓度。参见图7。

[0634] 约克郡(Yorkshire)长白(landrace)杂交猪经过麻醉并植入静脉导管,用于输注化合物1或载体(PBS)并采集血样。两只动物在2.5小时内接受递增剂量的化合物1(2-6mg/kg/min),其中剂量每30min增加1mg/kg/min。一只动物以2mg/kg/min的恒定速率输注。对照动物灌注PBS。以30min的间隔采集血样并通过离心分离血浆。血浆和组织样品冷冻保存,然后使用Thermo Vanquish UPLC+Thermo Quantis三重四极MS仪、Acquity UPLC HSS C18(100×2.1mm,1.8 $\mu$ m)色谱柱采用保护过滤器和梯度洗脱在LC/MS方法中分析琥珀酸酯:A=0.1%甲酸,B=乙腈。 $[^{13}\text{C}]$ -标记琥珀酸酯用作内标。

[0635] 血浆琥珀酸酯浓度与化合物1输注时间成正比增加(图7中的A)验证琥珀酸酯从化合物1中的释放。在研究结束时,TCA循环中琥珀酸酯的主要代谢物富马酸盐在接受化合物1的动物的组织中,尤其是在具有高代谢活性的组织如视网膜、脑和心脏中,比载体动物中更高。因此,数据表明,化合物1将可代谢琥珀酸酯递送至这些组织并具有通过血脑屏障的能力。

[0636] 来自三只动物组合的血乳酸数据以初始值的百分比表示,并绘制为采样时累积剂量的函数(图7中的C)。

[0637] 在静脉输注化合物1后,乳酸相对于初始值降低,表明化合物1将琥珀酸酯递送至络合物2并增加对线粒体电子传递链的电子供给,以增加ATP生产并减少对于丙酮酸糖酵解转化为乳酸的需要。

[0638] 实施例14-鱼藤酮诱导的线粒体络合物1功能障碍的猪模型

[0639] 化合物1的输注恢复了器官中鱼藤酮(rotenone)耗尽琥珀酸水平并减少了脑中鱼藤酮诱导乳酸。参见图8。

[0640] 为了研究鱼藤酮介导的络合物1抑制作用,约克郡长白杂种猪经过麻醉并植入静脉导管,用于同时输注鱼藤酮和化合物1或载体(PBS)。在1.5小时内输注鱼藤酮(7.1mg/h)。在2.5小时内以2mg/kg/min的恒定速率输注化合物1。对照动物输注PBS。以30min的间隔采集血样并通过离心分离血浆。通过将微透析探针插入大脑纹状体中而收集微透析液,并使用ISCUS仪(MDialysis)分析乳酸。在输注结束时,对动物实施安乐死并收集终末血

液和器官样本。血浆和组织样品冷冻保存,然后使用Thermo Vanquish UPLC+Thermo Quantis三重四极MS仪、Acquity UPLC HSS C18 (100x2.1mm, 1.8 $\mu$ m) 色谱柱采用保护过滤器和梯度洗脱在LC/MS方法中分析琥珀酸酯;A=0.1%甲酸,B=乙腈。[<sup>13</sup>C]-标记琥珀酸酯用作内标。乳酸数据表示为鱼藤酮输注开始前获得的基线值的百分比。

[0641] 鱼藤酮输注将琥珀酸酯的组织浓度降低至低于定量(<2 $\mu$ M)的水平,表明琥珀酸酯的利用率增加而补偿了从络合物1电子转移的减少。化合物1的给药将组织琥珀酸浓度恢复到可检测的水平,表明通过化合物1递送的琥珀酸酯超过了由络合物1抑制引起的琥珀酸利用率增加。此外,化合物1的给药抵消了鱼藤酮诱导脑乳酸增加,证实了通过将琥珀酸酯递送至脑而对丙酮酸糖酵解转化为乳酸的需求减少。

[0642] 实施例15-络合物1功能障碍的小鼠遗传Ndufs4敲除模型

[0643] 从断粮(第21天)起在饮用水中给药化合物1(1mg/mL)导致体重暂时增加,并且在高浓度组中出现延长存活的趋势。参见图9。

[0644] 对络合物I基因Ndufs4进行基因消融的C57BL/6小鼠(Quintana et al., Proceedings of the National Academy of Sciences. 107, 24 (2010), 10996-11001)在断粮后的饮用水或普通饮用水中提供化合物1(1mg/mL)。每10天监测一次体重发育(图9中的A),并每天监测动物健康(图9中的B)。化合物1在前10天内提高了体重增益( $p<0.05$ )并提高了存活率( $p=0.0697$ )。结果表明,在具有Leigh综合征特征的线粒体络合物I功能障碍I的遗传模型中,能够实现化合物1形式的琥珀酸补充剂的治疗益处。

[0645] 实施例16-鱼藤酮诱导的运动功能障碍和乳酸酸中毒的大鼠模型

[0646] 在饮用水中给药的化合物1会防止运动功能障碍并降低血乳酸浓度。参见图10。

[0647] 鱼藤酮诱导大鼠帕金森病模型(Cannon et al., Neurobiol Dis. 2009 May; 34 (2): 279-90)用于研究口服给药化合物1对络合物1抑制引起的运动和代谢功能障碍的影响。

[0648] 12周龄Lewis大鼠(每组6只动物)每天接受腹腔注射鱼藤酮(0.25-0.75mg/kg),持续4天。化合物1以0.25和0.75mg/mL的浓度溶解于饮用水中。在第4天进行功能测试和乳酸测量。通过将动物置于透明玻璃圆筒(高度=30cm; 直径=18cm)中在5min内测量后腿直立(rearing)。为了归类为后腿直立,前肢应该高于肩部水平,并用一侧或双侧前肢与筒壁接触。

[0649] 在覆盖有P-120砂纸的桌面上测量姿势不稳定性,每厘米标有线和数字(见下文)。将动物保持于垂直位置(类似“独轮车(wheelbarrow)”的位置),与表面成近90°角,而一只前肢轻轻地靠在动物的躯干上。然后将动物的重心向前移动到单个种植的前肢上以触发两个“追赶”步骤,以重新获得平衡。鼻子位置的变化被记录为触发不受约束的前肢追趕步骤的距离。对每个前肢重复实验3次,并计算两个前肢的平均值。在VetScan iSTAT-1分析仪中测量血乳酸(图10中的C)。

[0650] 鱼藤酮处理导致后腿直立活动减少。与接受水的受处理动物相比,在饮用水中给药化合物1(0.75mg/mL)导致后腿直立(图10中的A)和姿势不稳定性(图10中的B)显著增加。因此,数据表明化合物1是口服生物可利用的,并能够改善由线粒体络合物I功能障碍引起的运动功能障碍。

[0651] 用鱼藤酮治疗动物的血乳酸浓度显著增加。从饮用水中化合物1的低浓度(0.25mg/mL)到高浓度(0.75mg/mL)有降低血液中的乳酸浓度的趋势。数据表明,当通过口

服途径在饮用水中间歇给药时,从化合物1递送的琥珀酸酯能够在糖酵解和丙酮酸转化为乳酸的水平上实现代谢补偿,并间接表明了作为口服治疗的适用性。

[0652] 实施例17-琥珀酸释放数据

[0653] 简而言之,在50/50DMSO/MeCN (200mM, × 200) 中制备化合物1批次12的原液。然后将该混合物以1/10稀释到微粒体缓冲液 (20mM, × 20) 中,该缓冲液由K<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, 13.9g/L, 无水)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, 2.72g/L, 无水)、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Fisher, 1.02g/L) 和EDTA (Sigma Aldrich, 0.375g/L) 溶解于HPLC级水中构成。然后在微粒体缓冲液 (200mM, × 20) 中制备200mM丙二酸 (Sigma Aldrich) 原液。还在微粒体缓冲液 (20mM, × 10) 中制备20mM NADPH原液。在7mL小瓶中制备微粒体原液 (Sekisui Xe-noTech, 0.625mg/mL)。每个时间点 (T=0、5、15、60min) 的样品如下制备:80μL微粒体原液 (0.5mg/mL最终浓度)、5μL化合物原液 (2mM最终浓度)、5μL丙二酸原液 (10mM终浓度)。通过添加100μL MeOH淬灭T=0样品。然后通过添加10μLNADPH原液 (2mM最终浓度) 启动所有时间点的反应。在每个时间点,通过加入100μL MeOH终止反应。将样品振摇1min,置于冰上10min,然后以3000rpm离心10min。然后通过LCMS分析上清液。

[0654] 表25

时 间 (min)	LCMS 检测的物质		
	化合物 1 (mM)	琥珀酸 (mM)	琥珀酸单甲酯 (mM)
[0655]	0.934	0.058	0.088
	0.688	0.136	0.161
	0.388	0.285	0.205
	0.080	0.599	0.308

[0656] 根据数据可以看出,当与微粒体 (microsome) 一起培养时,化合物1会随时间释放琥珀酸。

[0657] 实施例18-矿物不稳定性

[0658] 将化合物1批次14 (2-3mg) 溶解于室温注射用水 (WFI) (1mg/mL) 中,其中含有自来水中常见的不同矿物质来源(具有不同的伴随反离子,以能够区分阳离子或阴离子的作用之间的差异) 并且在不同的时间间隔采集样品用于HPLC分析。

[0659] 以无机盐形式使用的矿物质来源:

[0660] CuCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NiSO<sub>4</sub>、CoCl<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、MnCl<sub>2</sub>、NaF、NaNO<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>、Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、AlSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>。

[0661] 表26

时间 (天数)	与添加到 HPLC 水中的每种不同盐的 T=0 时间点相比, 剩余化合物 1 百分比 (%)						
	WFI	CuCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NiSO <sub>4</sub>	CoCl <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	MnCl <sub>2</sub>
[0662]	100	100	100	100	100	100	100
	98.7	99.5	100	98.4	101	101	98.9
	97.7	98.3	97.9	99.1	101	99.8	99.2

时间 (天数)	与添加到 HPLC 水中的每种不同盐的 T=0 时间点相比, 剩余化合物 1 百分比 (%)						
	NaF	NaNO <sub>3</sub>	CuSO <sub>4</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	AlSO <sub>4</sub>	CaCO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
0	100	100	100	100	100	100	100
7	101	99.2	100	99.4	99.8	79.5	91.3
14	100	99.4	99.4	98.9	100	66.0	87.4

[0664] 根据数据能够看出, 化合物1在含有碳酸根离子的水溶液中降解更快。

[0665] 实施例19-碳酸盐不稳定性

[0666] 化合物1批次14(2-3mg)溶解于室温HPLC级水中(1mg/mL), 其中含有不同来源的钙离子和碳酸根离子(每个来源有两种浓度, 记录了pH值), 并在不同的时间间隔采集样品用于HPLC分析。

[0667] 以无机盐形式使用的钙和碳酸盐来源:

[0668] CaCl<sub>2</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

[0669] 表27

时 间 ( 天 数)	与添加到 HPLC 水中的每种不同矿物质的 T=0 时间点相比, 剩余化合物 1 百分比 (%)				
	HPLC 水 (对照, pH 6.5)	CaCO <sub>3</sub> (3.4 mM, pH 7.6)	CaCO <sub>3</sub> (0.34 mM, pH 7.6)	CaCl <sub>2</sub> (3.4 mM, pH 7.5)	CaCl <sub>2</sub> (0.34 mM, pH 7.4)
0	100	100	100	100	100
3	94.3	93.6	93.8	101	98.4
17	91.4	49.5	50.4	96.7	95.1

时间 (天数)	与添加到 HPLC 水中的每种不同矿物质的 T=0 时间点相比, 剩余化合物 1 百分比 (%)			
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (3.4 mM, pH 7.2)	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0.34 mM, pH 7.3)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.4 mM, pH 9.3)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.4 mM, pH 8.9)
0	100	100	100	100
3	100	101	98.9	99.6
17	97.1	97.5	57.5	85.5

[0672] 根据数据能够看出, 化合物1在含碳酸根离子的水溶液中降解更快。

[0673] 实施例19-碳酸盐浓度依赖性

[0674] 化合物1批次14(2-3mg)溶解于含有不同浓度碳酸钙的HPLC级水中(1mg/mL), 并在不同时间间隔取样用于HPLC分析。

[0675] 表28:

时 间 ( 天 数 )	与添加到 HPLC 水中的每种不同矿物质的 T=0 时间点相比, 剩余化 合物 1 百分比 (%)				
	CaCO <sub>3</sub> (0 mM)	CaCO <sub>3</sub> (0.425 mM)	CaCO <sub>3</sub> (0.85 mM)	CaCO <sub>3</sub> (1.7 mM)	CaCO <sub>3</sub> (3.4 mM)
0	100	100	100	100	100
7	98.7	98.1	97.8	93.8	83.4
14	98.6	98.4	97.1	90.8	71.4

[0677] 实施例20-动力学溶解度

[0678] 将固体化合物1批次s3、s12-17 (~ 80mg) 添加到平坦透明底部96孔板的孔中。加入 5°C PBS 以得到所有批次的 460mg/mL 终浓度 01-354。添加 PBS 后, 将孔板搅拌 10 秒, 然后立即通过 Epoch 微孔板分光光度计 (BioTek) 在 620nm 处实时分析浊度 3min。从所记录数据的指数衰减拟合计算溶解速率常数。

[0679] 表29:

化合物1批次编号	速率常数, k (s <sup>-1</sup> )
3	0.014
12	0.022
13	0.013
14	0.011
15	0.074
16	0.055
17	0.111

[0681] 结晶度评价的通用方法

[0682] 使用 Bruker AXS D8 discover HTS 进行 X-射线粉末衍射研究。

[0683] 阳极: Cu 阳极, 电压为 40kV 和 4mV; 哥贝尔 (Göbel) 镜和线光学。

[0684] 探测器: 线性检测器 (LYNXEYE XE), 接收器狭缝为 2.95°。

[0685] 测量: 扫描范围 2-45° 2θ, 1s/步, 0.005°/步

[0686] 数据采集软件: Diffrac Commander v7.3.3.0.0

[0687] 数据分析软件: Diffrac Eva v4.2.1

[0688] 没有应用背景校正或平滑处理。数据报告为峰 2θ 角度和强度。为了确定结晶度程度, 将所有定义峰的合并面积除以曲线下的总面积并表示为百分比。

[0689] 峰列表

[0690] 以下列表详细说明了 XRPD 后在许多结晶批次上返回的峰。带下划线的峰对于大多数批次是共有的。角旁边有星号的峰可能是多晶型更常见或独有的峰。

[0691] 峰列表 NV354-s3-批次3

[0692]

角度	d 值	强度	相对强度
9.4	9.389	54	1.4%
<u>10.9</u>	<u>8.136</u>	<u>453</u>	<u>12.1%</u>
11.1*	7.997	1270	33.7%
11.4	7.777	110	2.9%
12.9	6.870	208	5.5%
13.1	6.776	1240	32.9%
<u>13.1</u>	<u>6.728</u>	<u>120</u>	<u>3.2%</u>
13.8	6.420	36	1.0%
14.5	6.104	60	1.6%
<u>14.9</u>	<u>5.939</u>	<u>406</u>	<u>10.8%</u>
15.6	5.659	63	1.7%
<u>16.2</u>	<u>5.476</u>	<u>179</u>	<u>4.8%</u>
16.9*	5.246	89	2.4%
17.9	4.941	89	2.4%
18.5	4.785	49	1.3%
19.2	4.624	176	4.7%
19.6	4.528	226	6.0%
19.7	4.499	214	5.7%
<u>20.1</u>	<u>4.418</u>	<u>111</u>	<u>3.0%</u>
<u>21.4</u>	<u>4.143</u>	<u>831</u>	<u>22.1%</u>
21.7	4.100	95	2.5%
<u>22.2</u>	<u>3.994</u>	<u>163</u>	<u>4.3%</u>
22.7	3.919	698	18.6%
<u>22.8</u>	<u>3.893</u>	<u>1410</u>	<u>37.4%</u>
<u>23.1</u>	<u>3.847</u>	<u>2760</u>	<u>73.4%</u>
<u>23.3</u>	<u>3.813</u>	<u>307</u>	<u>8.2%</u>
<u>24.0</u>	<u>3.711</u>	<u>3760</u>	<u>100.0%</u>
24.4	3.640	58	1.5%
<u>24.8</u>	<u>3.591</u>	<u>602</u>	<u>16.0%</u>
25.2	3.538	78	2.1%

[0693]

25.5	3.487	283	7.5%
<b>26.1</b>	<b>3.409</b>	<b>1340</b>	<b>35.5%</b>
27.2	3.282	53	1.4%
27.7	3.221	76	2.0%
28.0	3.185	58	1.5%
28.5	3.128	48	1.3%
29.9	2.989	69	1.8%
30.2	2.956	115	3.1%
30.8	2.901	89	2.4%
30.9	2.890	73	1.9%
31.3	2.857	64	1.7%
31.6	2.829	29	0.8%
32.2	2.776	42	1.1%
32.8	2.730	27	0.7%
33.0	2.711	42	1.1%
33.2	2.694	59	1.6%
35.0	2.560	73	1.9%
35.4	2.536	37	1.0%
36.6	2.456	86	2.3%
38.6	2.333	49	1.3%
40.1	2.248	52	1.4%
41.6	2.169	58	1.5%
44.7	2.026	86	2.3%
44.8	2.022	57	1.5%

[0694] 峰列表NV354-s12-批次18

[0695]

角度	d 值	强度	相对强度
5.6	15.805	68	3.3%
9.4	9.390	99	4.9%
10.9	8.141	233	11.5%
11.1	7.949	365	18.0%
11.2	7.883	635	31.3%
11.4	7.744	252	12.4%
12.9	6.848	183	9.0%
13.2	6.710	103	5.1%
13.8	6.432	115	5.7%
14.9	5.941	446	22.0%
15.7	5.657	91	4.5%

[0696]

16.2	5.484	312	15.4%
16.9	5.243	288	14.2%
17.3	5.119	107	5.3%
18.1	4.902	87	4.3%
18.6	4.779	60	3.0%
19.3	4.607	274	13.5%
19.3	4.594	154	7.6%
19.7	4.506	164	8.1%
20.1	4.411	505	25.0%
21.4	4.148	1030	51.1%
21.6	4.110	160	7.9%
22.2	4.001	395	19.5%
22.7	3.919	2030	100.0%
22.8	3.892	1960	96.6%
23.0	3.865	1990	98.3%
23.2	3.824	204	10.1%
24.0	3.709	90	4.5%
24.5	3.637	122	6.0%
24.8	3.593	226	11.1%
25.1	3.539	227	11.2%
25.5	3.487	126	6.2%
26.1	3.407	151	7.4%
27.8	3.210	196	9.7%
28.5	3.124	53	2.6%
32.8	2.728	41	2.0%
35.0	2.560	64	3.2%
37.7	2.386	75	3.7%
41.6	2.169	62	3.0%
43.0	2.104	26	1.3%

[0697] 峰列表NV354-s13-批次13

[0698]

角度	d 值	强度	相对强度
7.9	11.190	39	2.3%
9.4	9.405	118	6.9%
10.9	8.136	668	39.3%
11.1	7.963	408	24.0%
11.2	7.884	294	17.3%
11.4	7.743	179	10.5%
12.9	6.858	209	12.3%
13.2	6.709	103	6.1%
13.8	6.432	26	1.6%
14.5	6.099	71	4.2%

14.9	5.954	474	27.9%
15.6	5.659	155	9.1%
16.2	5.472	326	19.2%
16.9	5.250	134	7.9%
17.4	5.102	44	2.6%
18.1	4.906	89	5.2%
19.0	4.677	57	3.3%
19.2	4.619	269	15.8%
19.4	4.577	180	10.6%
19.7	4.505	162	9.5%
20.1	4.414	392	23.0%
21.4	4.145	536	31.5%
21.6	4.106	79	4.7%
22.3	3.990	396	23.3%
22.7	3.913	898	52.7%
22.9	3.887	1700	100.0%
23.1	3.855	1380	80.9%
23.3	3.812	336	19.8%
24.0	3.711	84	4.9%
24.6	3.620	131	7.7%
24.8	3.590	371	21.8%
25.2	3.536	152	8.9%
25.5	3.487	94	5.5%
26.1	3.407	195	11.4%
27.2	3.280	71	4.2%
27.8	3.210	100	5.9%
28.0	3.185	90	5.3%
29.6	3.015	47	2.8%
30.2	2.959	34	2.0%
30.8	2.902	72	4.2%
31.3	2.858	37	2.2%
31.6	2.827	27	1.6%
32.0	2.795	68	4.0%
32.8	2.730	79	4.6%
34.2	2.620	65	3.8%
34.4	2.602	52	3.0%
35.1	2.555	63	3.7%
35.4	2.535	66	3.9%
37.7	2.384	44	2.6%
40.1	2.246	35	2.1%
41.6	2.170	68	4.0%
44.2	2.049	27	1.6%

[0699]

[0700] 峰列表NV354-s14-批次14

[0701]

角度	d 值	强度	相对强度
7.9	11.145	111	5.5%
9.4	9.370	132	6.5%
10.8	8.175	130	6.4%
10.9	8.132	74	3.7%
11.1	7.992	343	16.9%
11.4	7.750	184	9.0%
12.9	6.841	73	3.6%
13.2	6.713	169	8.3%
14.9	5.935	113	5.6%
15.6	5.663	80	3.9%
16.2	5.484	161	7.9%
16.9	5.248	47	2.3%
18.0	4.937	33	1.6%
18.6	4.777	52	2.6%
19.4	4.564	220	10.9%
19.7	4.502	195	9.6%
20.1	4.421	46	2.3%
21.4	4.143	1150	56.5%
22.2	4.000	355	17.5%
22.7	3.921	2030	100.0%
22.9	3.888	509	25.1%
23.0	3.857	812	40.0%
24.5	3.624	173	8.5%
24.8	3.592	40	2.0%
25.2	3.537	89	4.4%
25.5	3.486	346	17.0%
26.0	3.427	122	6.0%
26.2	3.397	169	8.3%
27.1	3.282	63	3.1%
27.8	3.208	262	12.9%
28.0	3.182	57	2.8%
28.6	3.123	43	2.1%
28.7	3.113	52	2.6%
29.6	3.012	30	1.5%
30.3	2.951	82	4.0%
30.8	2.901	55	2.7%
31.2	2.864	31	1.5%
32.2	2.775	22	1.1%
33.0	2.711	55	2.7%

[0702]	34.2	2.618	83	4.1%
	34.8	2.577	44	2.2%
	35.1	2.556	57	2.8%
	36.2	2.483	167	8.2%
	37.3	2.408	69	3.4%
	37.7	2.386	44	2.2%
	39.8	2.266	26	1.3%
	41.6	2.169	83	4.1%
	41.7	2.164	45	2.2%

[0703] 峰列表NV354-s15-批次19

[0704]

角度	d 值	强度	相对强度
5.6	15.862	72	4.6%
7.9	11.170	52	3.3%
9.4	9.389	134	8.5%
10.8	8.151	388	24.6%
11.1	7.976	412	26.2%
11.2	7.907	400	25.4%
11.4	7.765	121	7.7%
12.9	6.846	108	6.8%
13.2	6.714	211	13.4%
13.7	6.440	41	2.6%
14.9	5.936	456	29.0%
15.6	5.660	134	8.5%
16.2	5.478	312	19.8%
16.9	5.252	122	7.7%
18.1	4.906	49	3.1%
19.0	4.673	58	3.7%
19.2	4.614	96	6.1%
19.7	4.506	170	10.8%
20.1	4.413	162	10.3%
21.4	4.143	943	59.9%
21.6	4.104	306	19.5%
22.2	3.997	318	20.2%
22.8	3.894	1400	88.7%
23.1	3.854	1570	100.0%
23.3	3.813	488	31.0%
23.9	3.716	81	5.1%
24.5	3.628	74	4.7%
24.5	3.627	109	6.9%

[0705]

24.8	3.592	139	8.8%
25.2	3.535	147	9.3%
25.6	3.482	146	9.3%
26.1	3.406	139	8.8%
27.2	3.281	52	3.3%
27.8	3.211	122	7.8%
29.6	3.012	34	2.2%
30.8	2.900	62	3.9%
33.0	2.715	25	1.6%
41.6	2.170	38	2.4%

[0706] 峰列表NV354-s16-批次16

角度	d 值	强度	相对强度
5.6	15.858	91	4.2%
7.9	11.148	63	2.9%
9.4	9.395	138	6.3%
10.9	8.134	401	18.4%
11.1	7.945	354	16.3%
11.2	7.891	514	23.6%
11.4	7.748	167	7.7%
12.9	6.852	100	4.6%
13.2	6.709	175	8.0%
13.8	6.424	72	3.3%
14.5	6.091	54	2.5%
14.9	5.943	370	17.0%
15.7	5.656	151	7.0%
16.2	5.479	233	10.7%
16.9	5.244	248	11.4%
17.4	5.106	31	1.4%
18.1	4.895	106	4.9%
18.6	4.777	43	2.0%
19.2	4.613	284	13.1%
19.4	4.583	214	9.8%
19.7	4.507	179	8.2%
20.1	4.413	274	12.6%
21.4	4.147	622	28.6%
21.6	4.102	210	9.7%
22.2	3.995	293	13.5%
22.7	3.921	834	38.3%
22.8	3.891	1490	68.2%

[0707]

[0708]	23.1	3.855	2180	100.0%
	23.3	3.813	279	12.8%
	24.0	3.711	87	4.0%
	24.5	3.627	100	4.6%
	24.8	3.592	266	12.2%
	25.2	3.533	180	8.3%
	25.5	3.489	122	5.6%
	26.2	3.403	162	7.4%
	27.1	3.283	36	1.6%
	27.8	3.207	173	7.9%
	28.0	3.184	49	2.2%
	28.5	3.125	34	1.6%
	29.6	3.015	33	1.5%
	30.8	2.905	82	3.8%
	31.6	2.829	44	2.0%
	32.0	2.791	24	1.1%
	32.8	2.725	42	1.9%
	34.2	2.618	71	3.3%
	35.0	2.559	61	2.8%
	35.4	2.537	28	1.3%
	36.1	2.484	35	1.6%
	37.7	2.387	48	2.2%
	40.2	2.244	47	2.2%
	41.6	2.170	98	4.5%

[0709] 峰列表NV354-s17-批次17

[0710]

Angle	d Value	Intensity	Rel. Intensity
7.9	11.171	108	2.6%
9.4	9.422	77	1.8%
10.8	8.158	297	7.1%
11.1	7.984	379	9.0%
11.2	7.873	790	18.9%
11.4	7.753	134	3.2%
12.8	6.892	114	2.7%
12.9	6.845	185	4.4%
13.2	6.715	179	4.3%
13.8	6.420	77	1.8%
14.9	5.931	349	8.3%
15.7	5.649	225	5.4%
16.2	5.462	184	4.4%

[0711]

16.9	5.248	303	7.2%
17.9	4.948	52	1.3%
18.5	4.785	40	0.9%
19.2	4.625	183	4.4%
19.3	4.586	263	6.3%
19.7	4.500	307	7.3%
20.1	4.416	220	5.3%
21.4	4.148	501	12.0%
21.6	4.105	145	3.5%
22.2	3.998	1100	26.3%
22.8	3.890	1700	40.6%
23.1	3.853	2000	47.7%
23.2	3.832	4190	100.0%
24.6	3.616	264	6.3%
24.8	3.590	771	18.4%
25.2	3.535	230	5.5%
25.5	3.489	127	3.0%
26.1	3.410	242	5.8%
27.8	3.207	285	6.8%
29.6	3.015	24	0.6%
30.8	2.901	151	3.6%
30.9	2.896	155	3.7%
31.2	2.861	314	7.5%
31.6	2.830	160	3.8%
33.1	2.707	38	0.9%
33.7	2.658	164	3.9%
34.2	2.621	62	1.5%
35.0	2.561	103	2.5%
38.6	2.331	95	2.3%
38.9	2.311	44	1.0%
40.7	2.216	77	1.8%
41.6	2.171	48	1.1%
42.4	2.129	34	0.8%

。

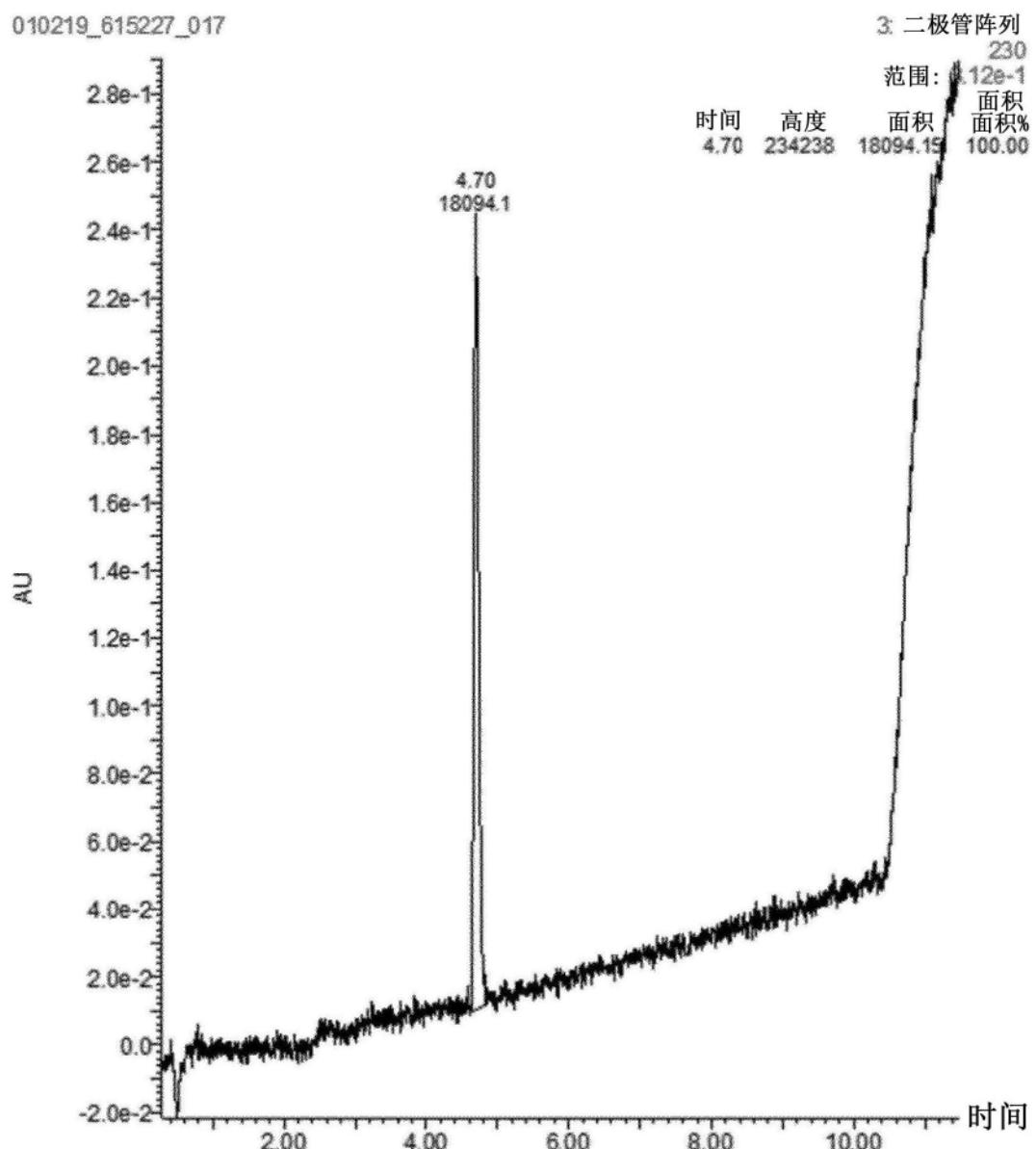


图1

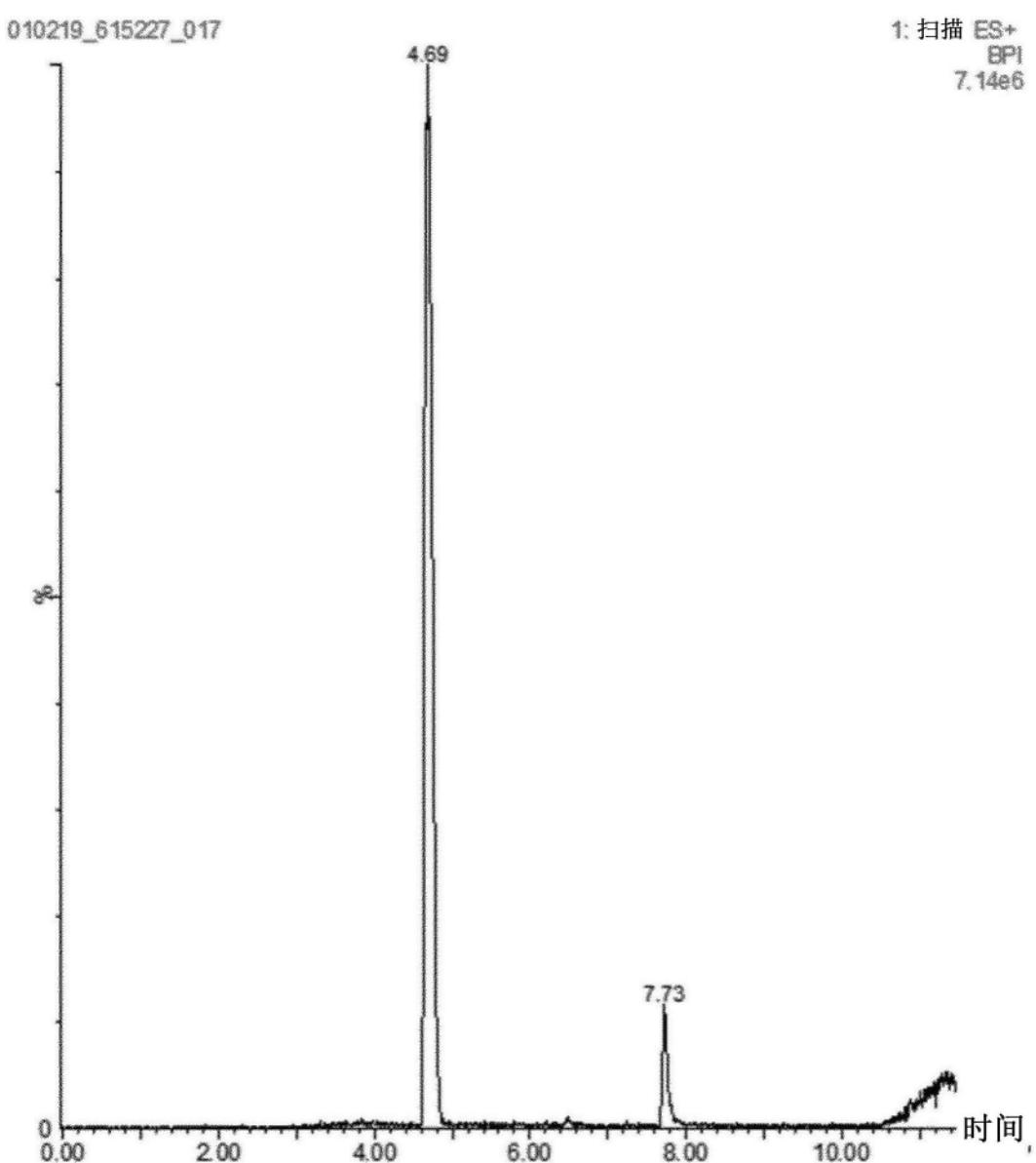


图2

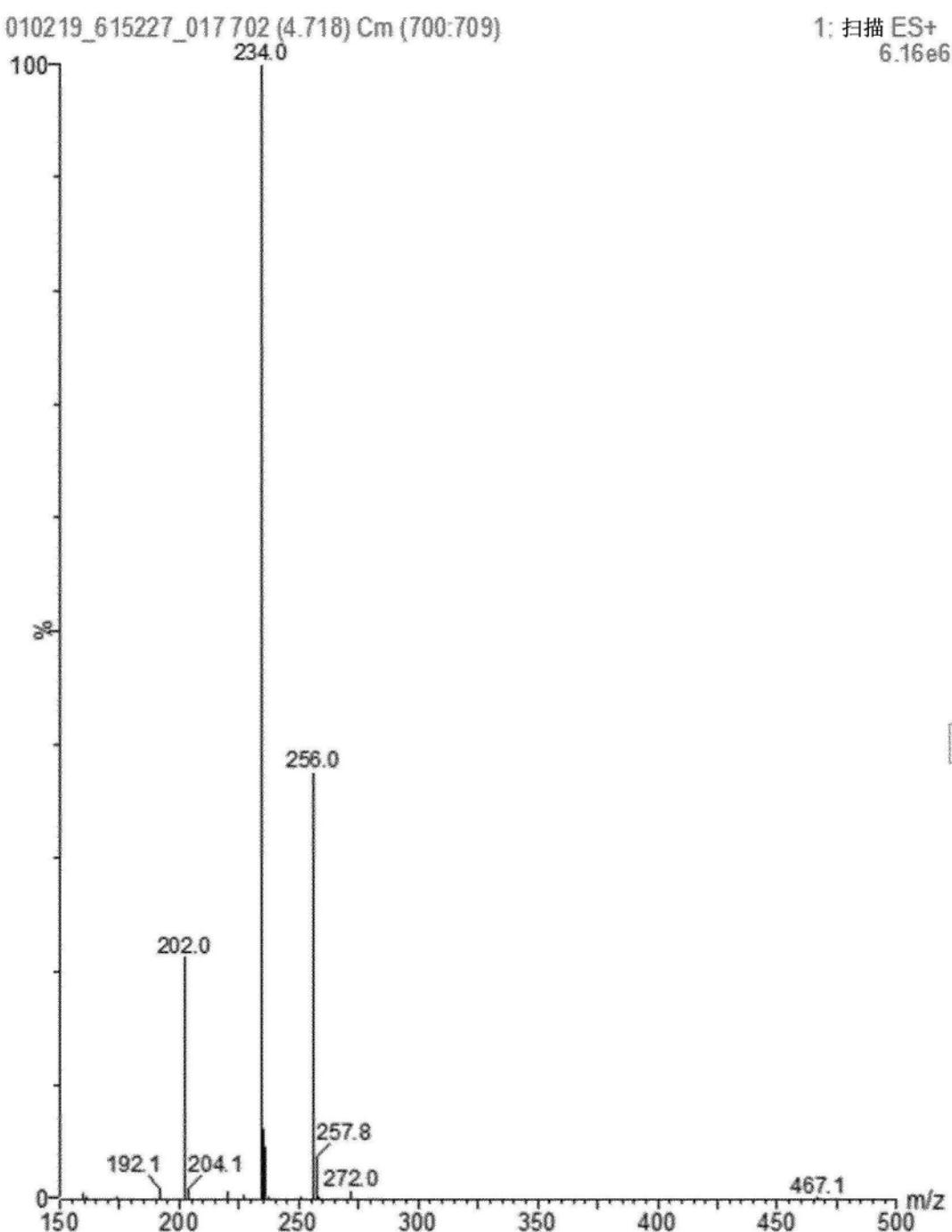


图3

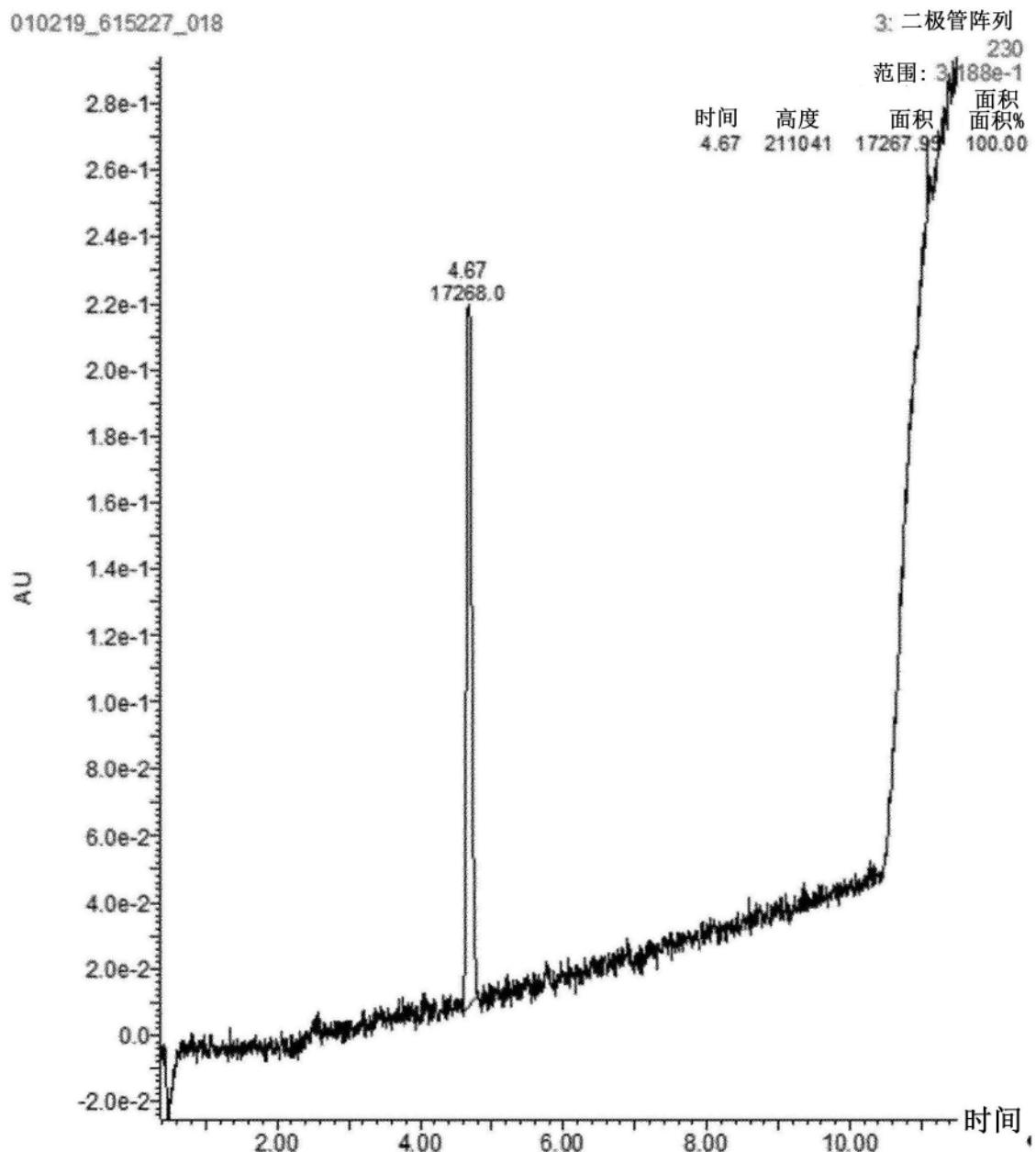


图4

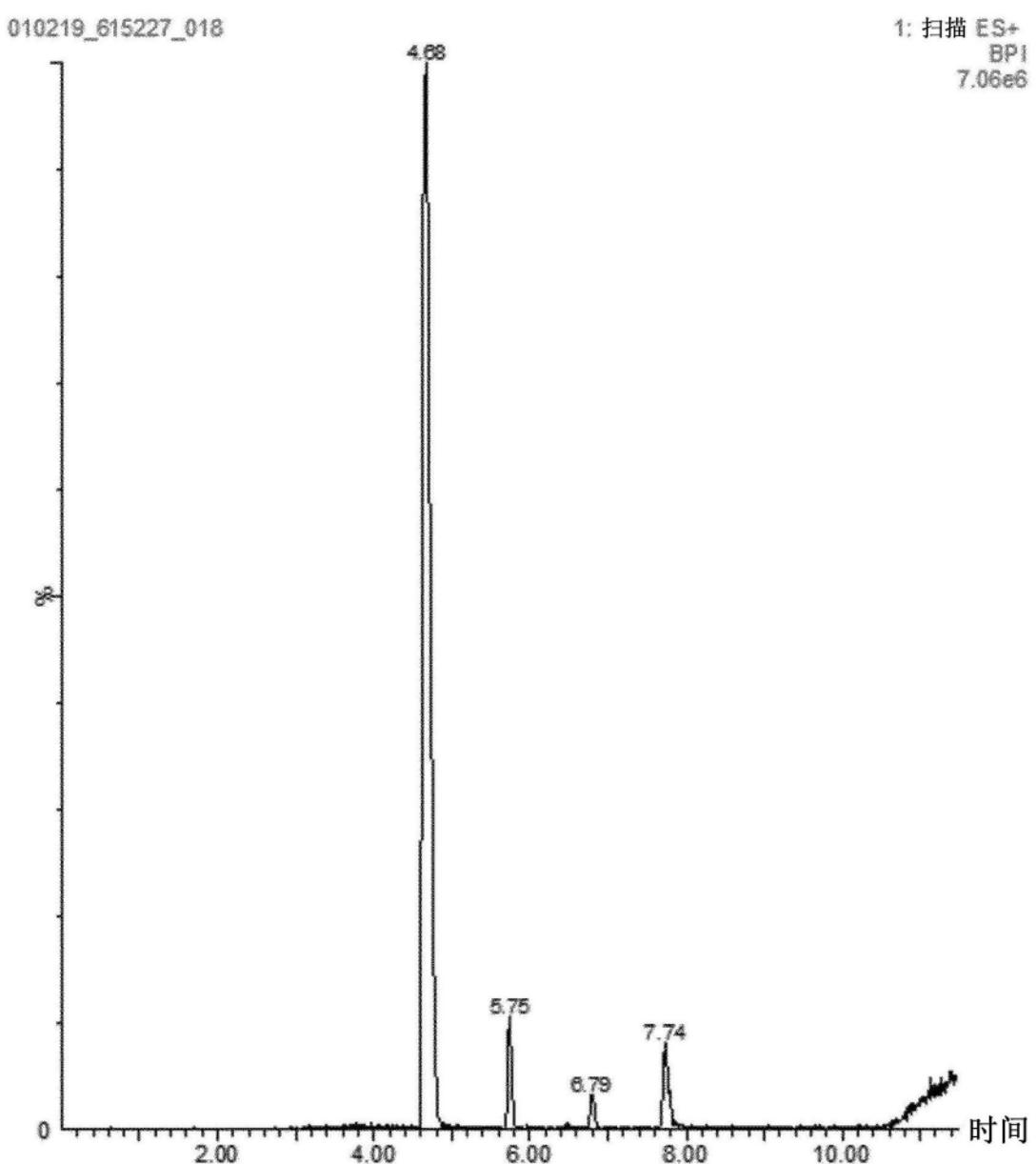


图5

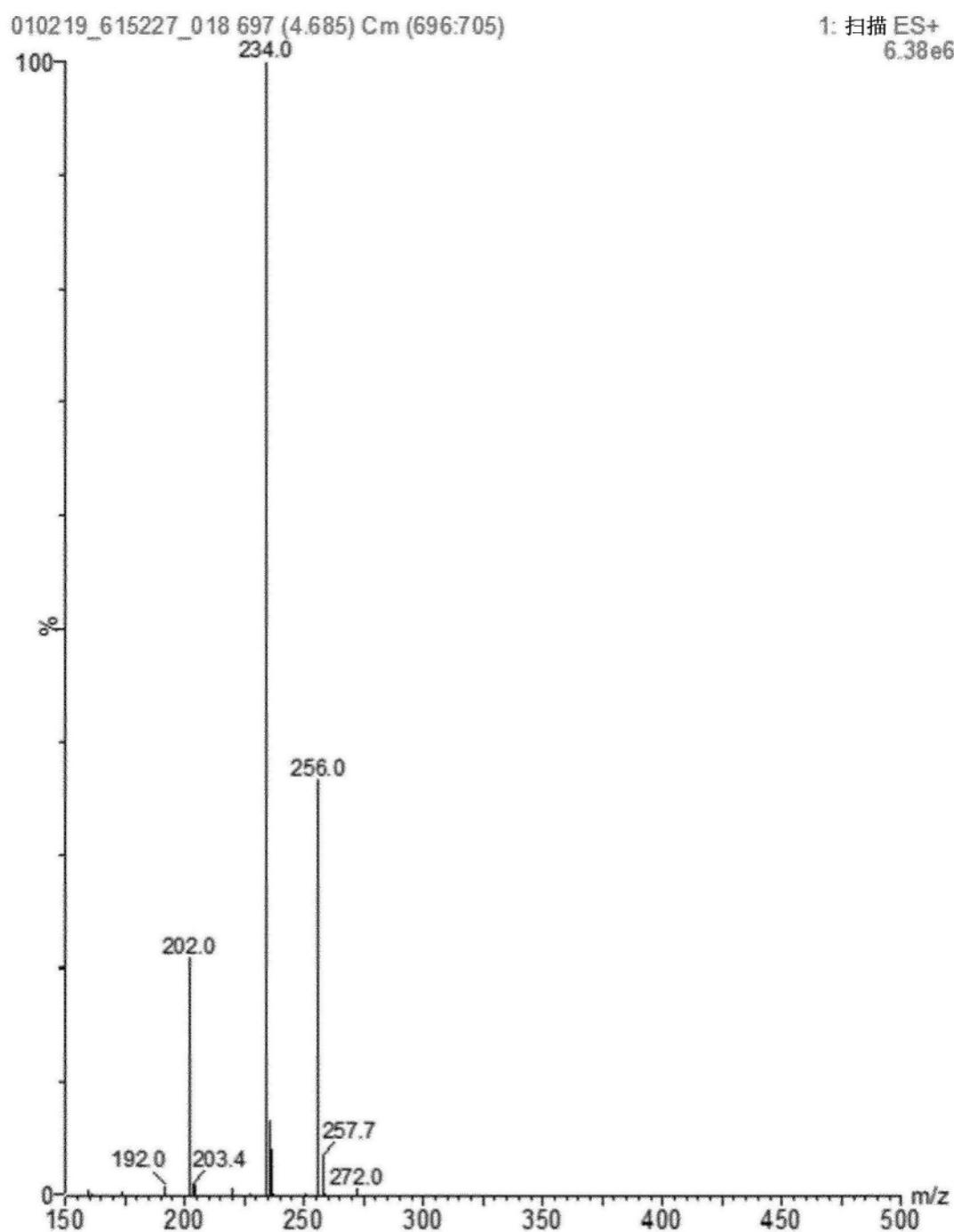


图6

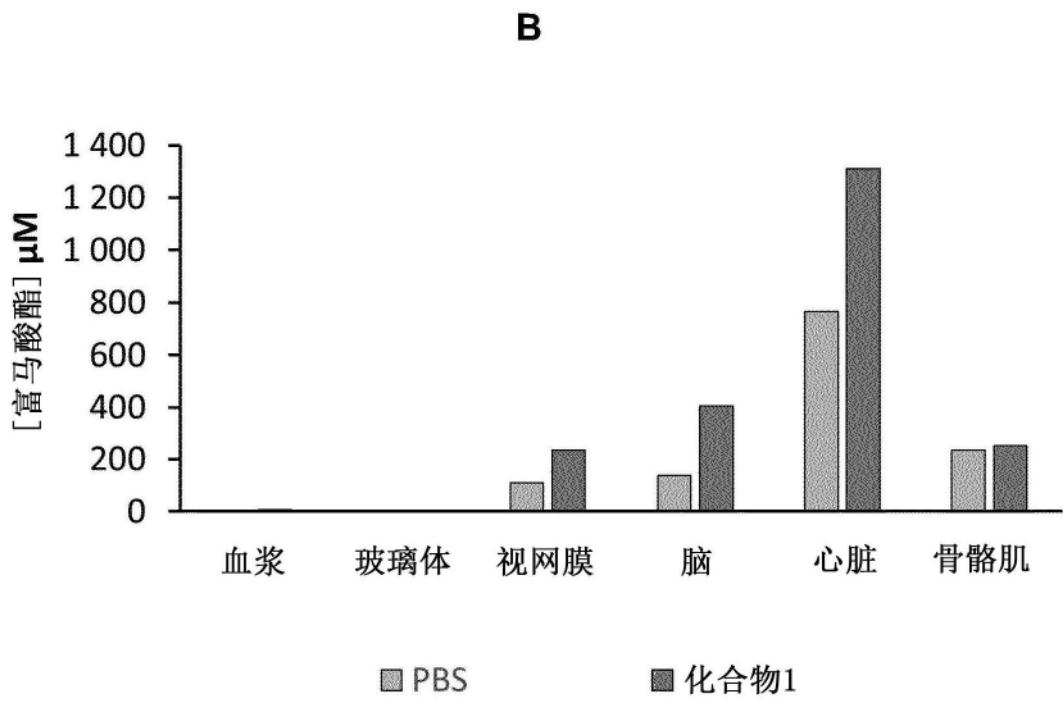
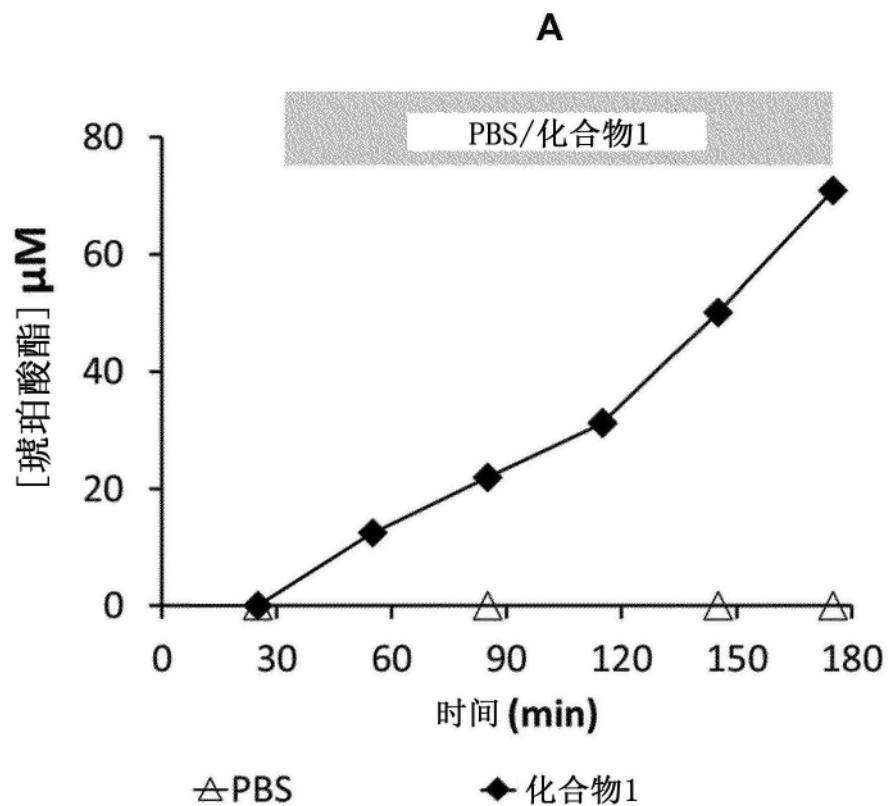


图7

C

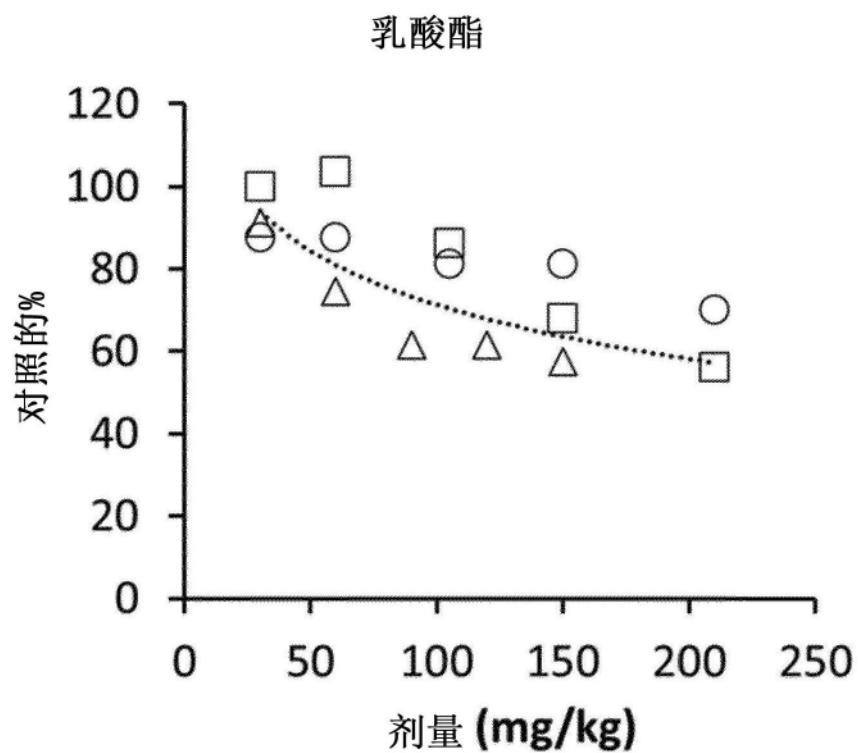
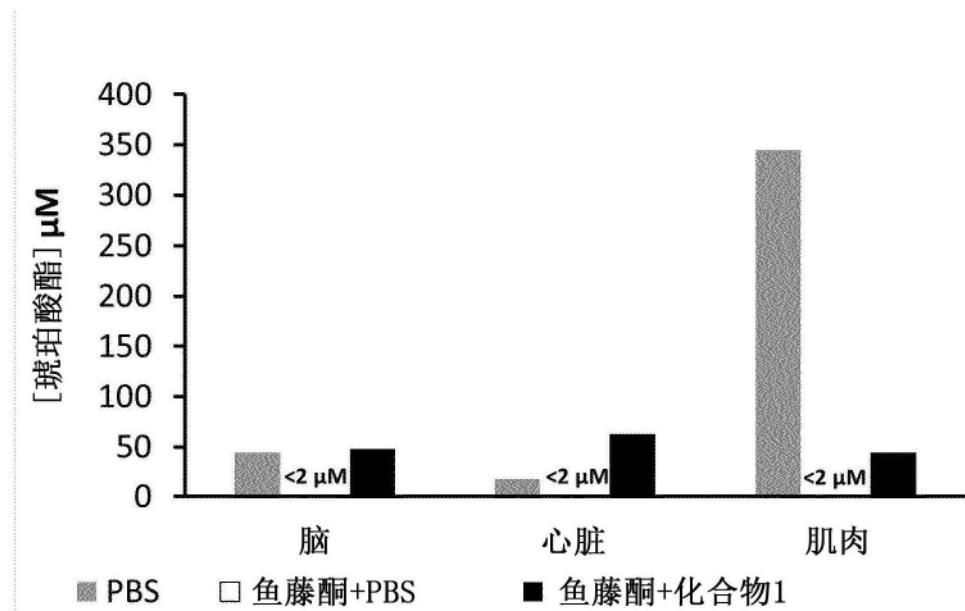


图7-续

A



B

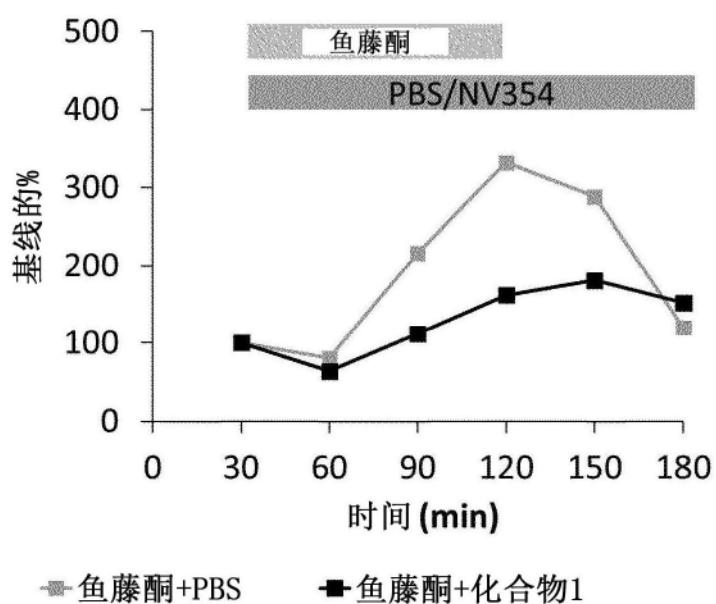
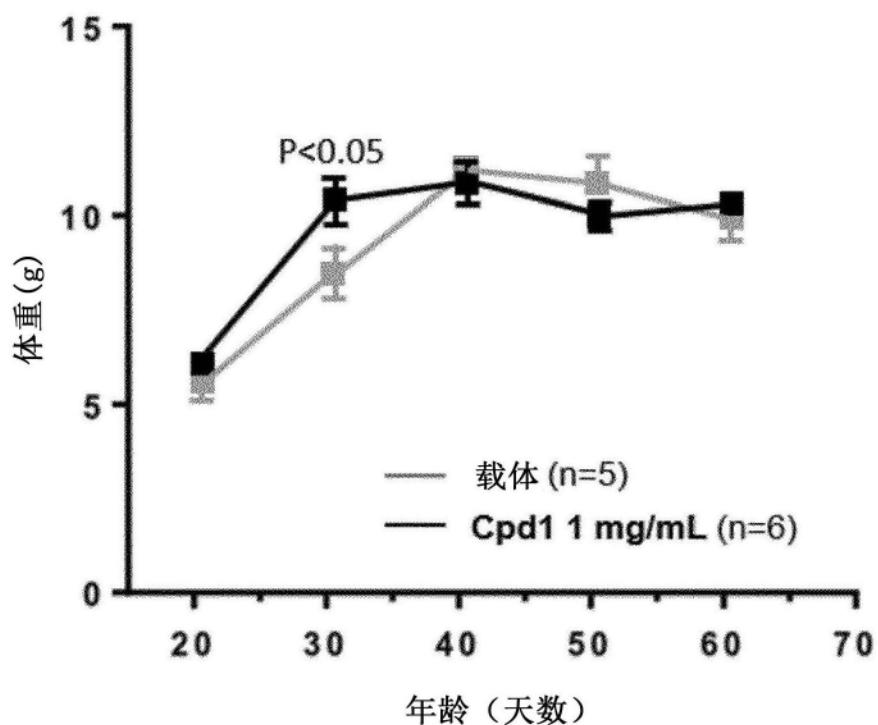


图8

A



B

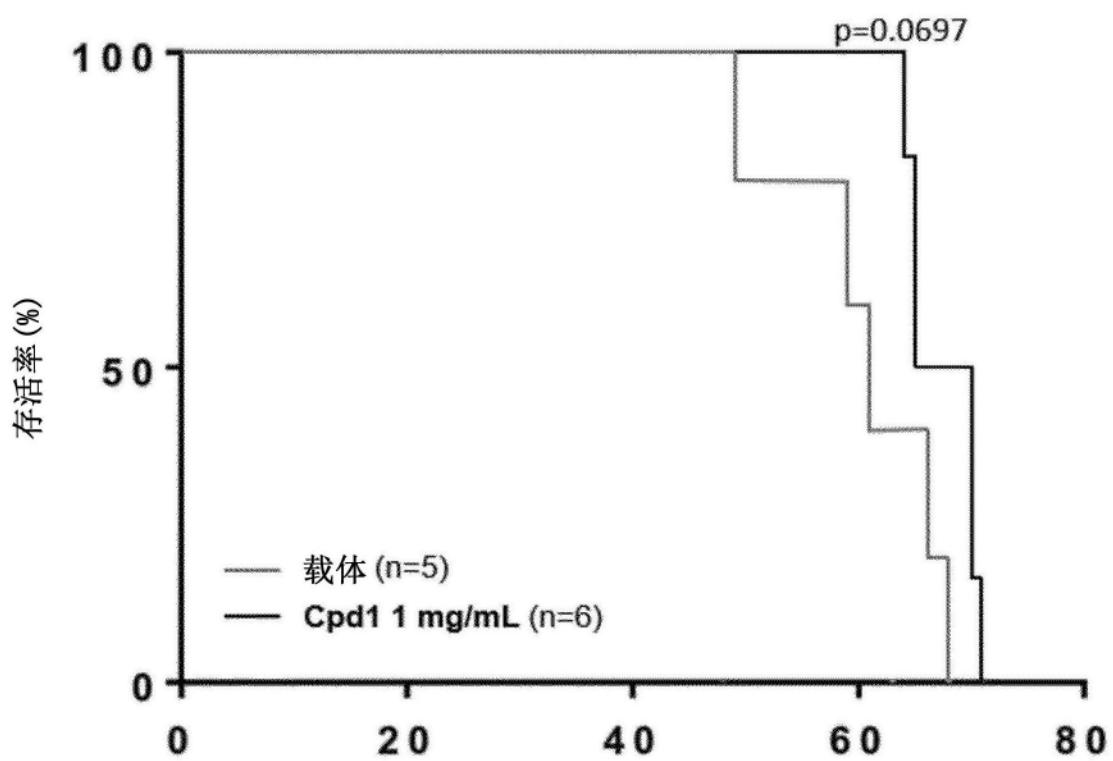
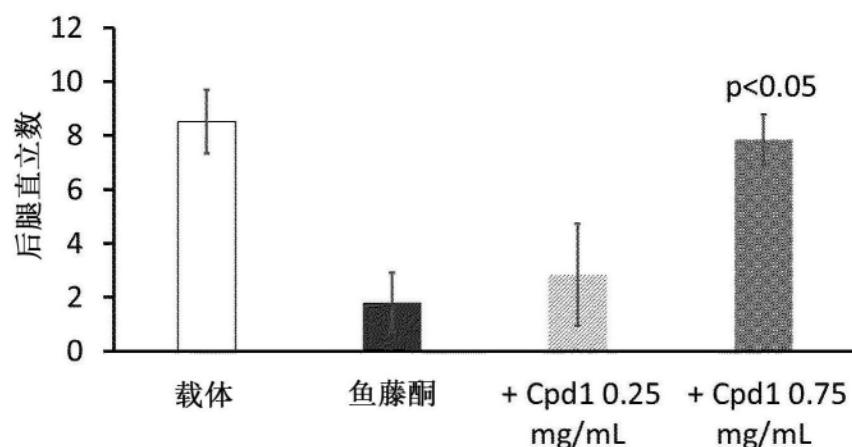


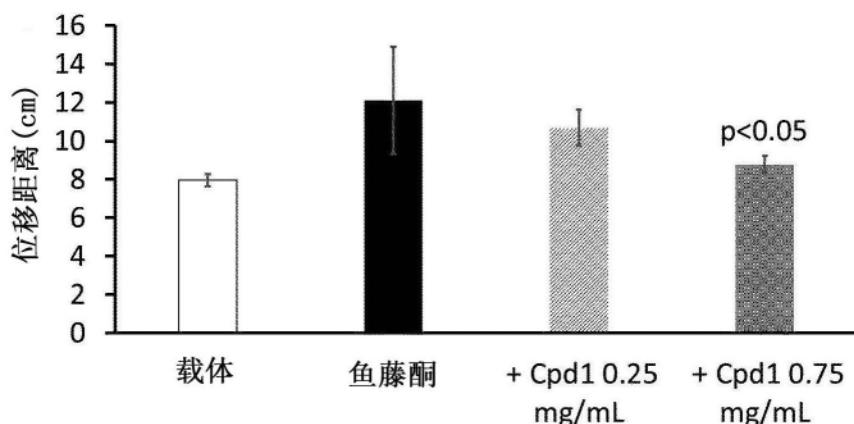
图9

**A**

后腿直立

**B**

姿势不稳定性

**C**

乳酸酯

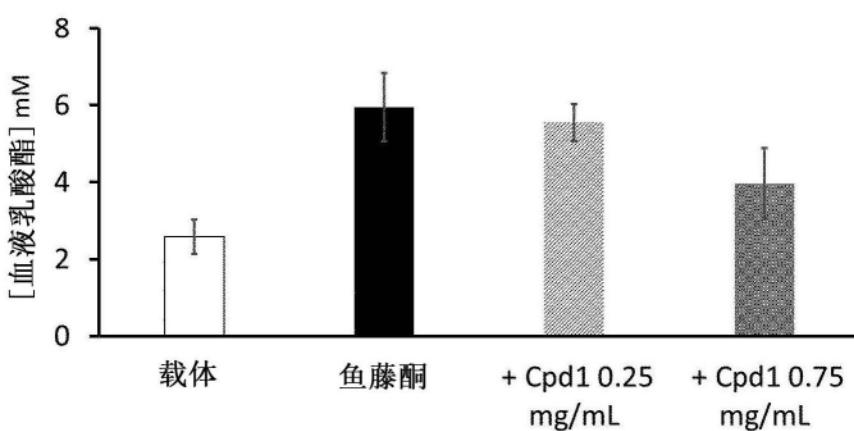


图10

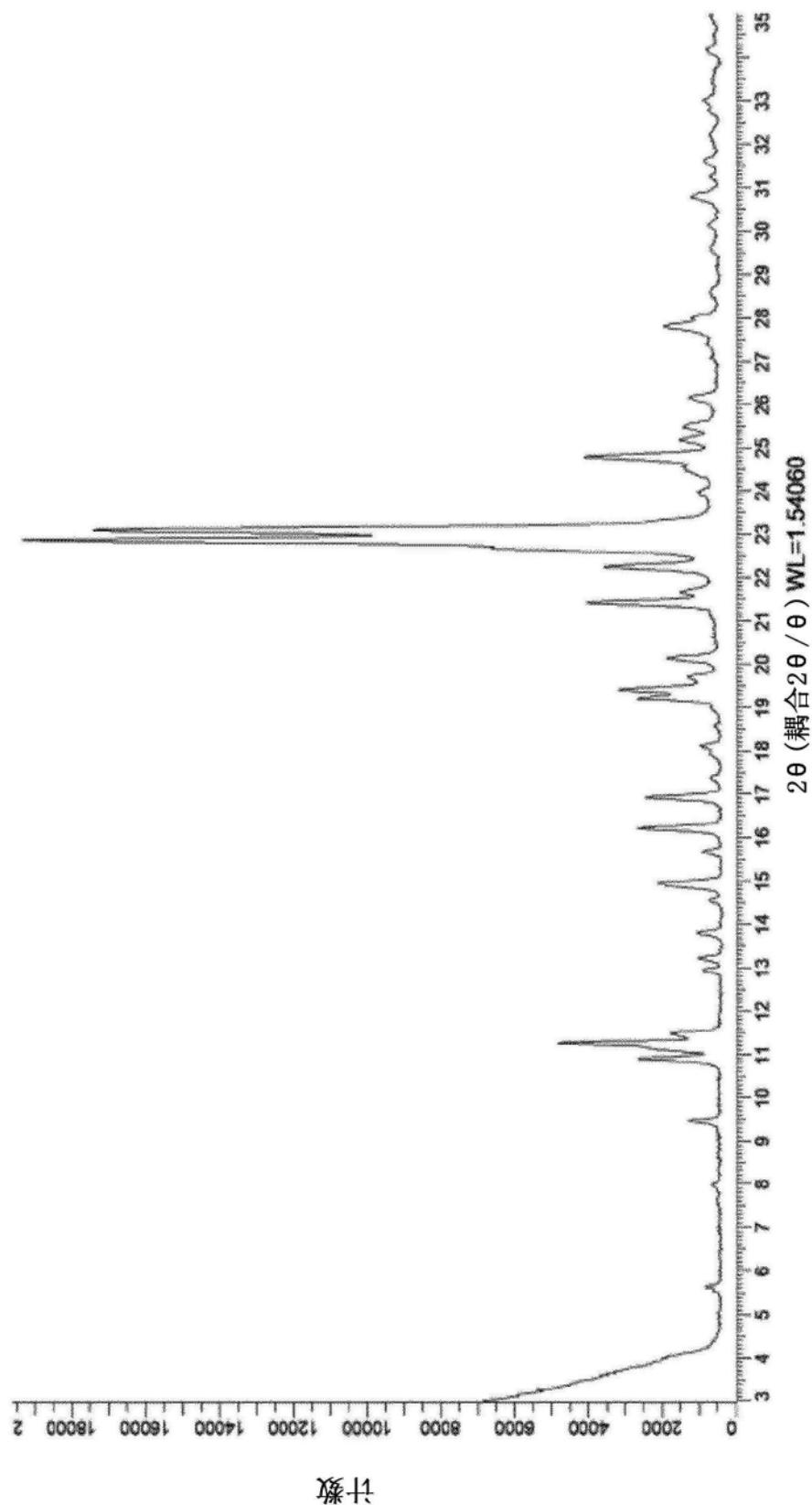
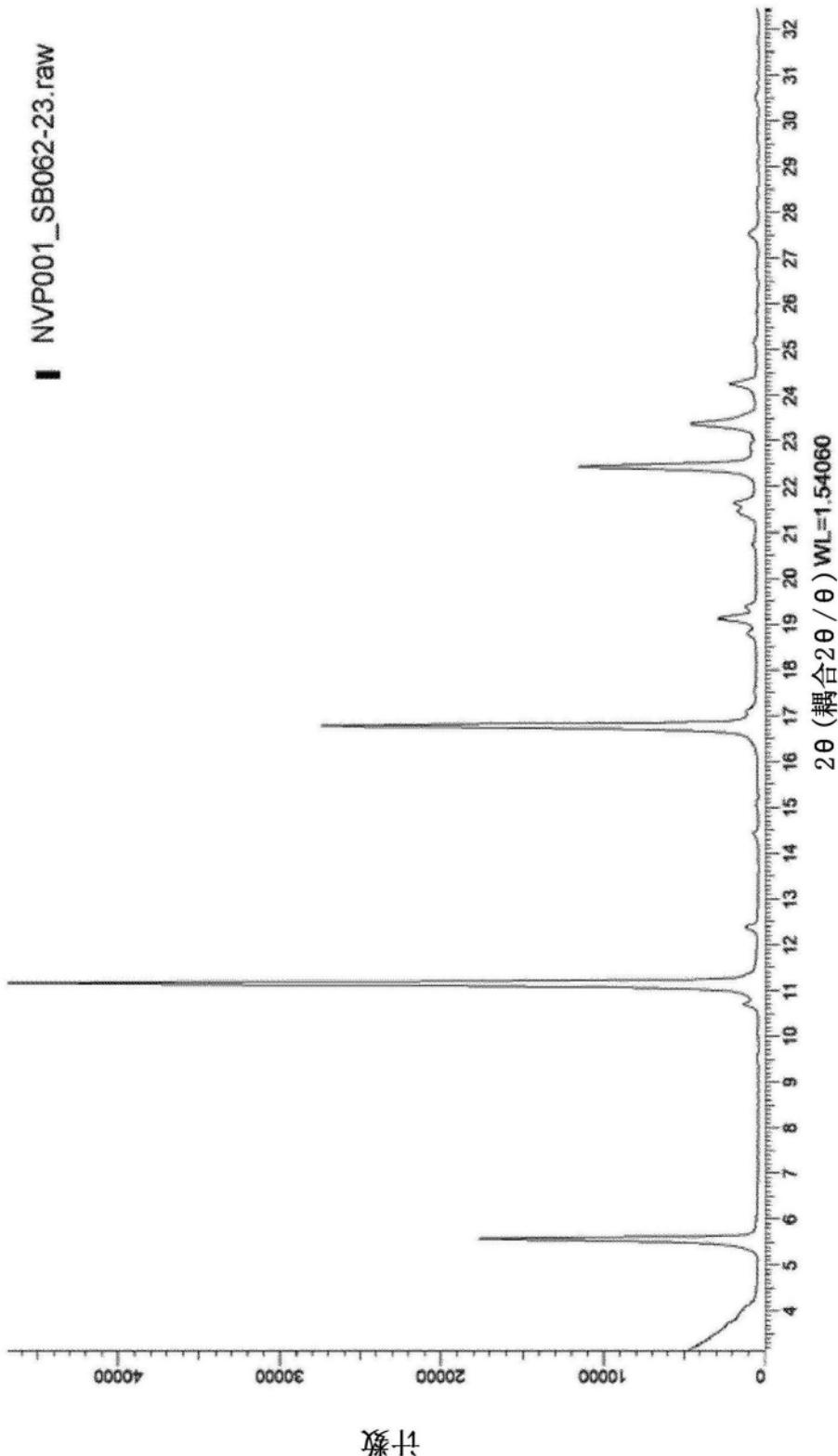


图11

| NVP001\_SB062-23.raw



计数

图12

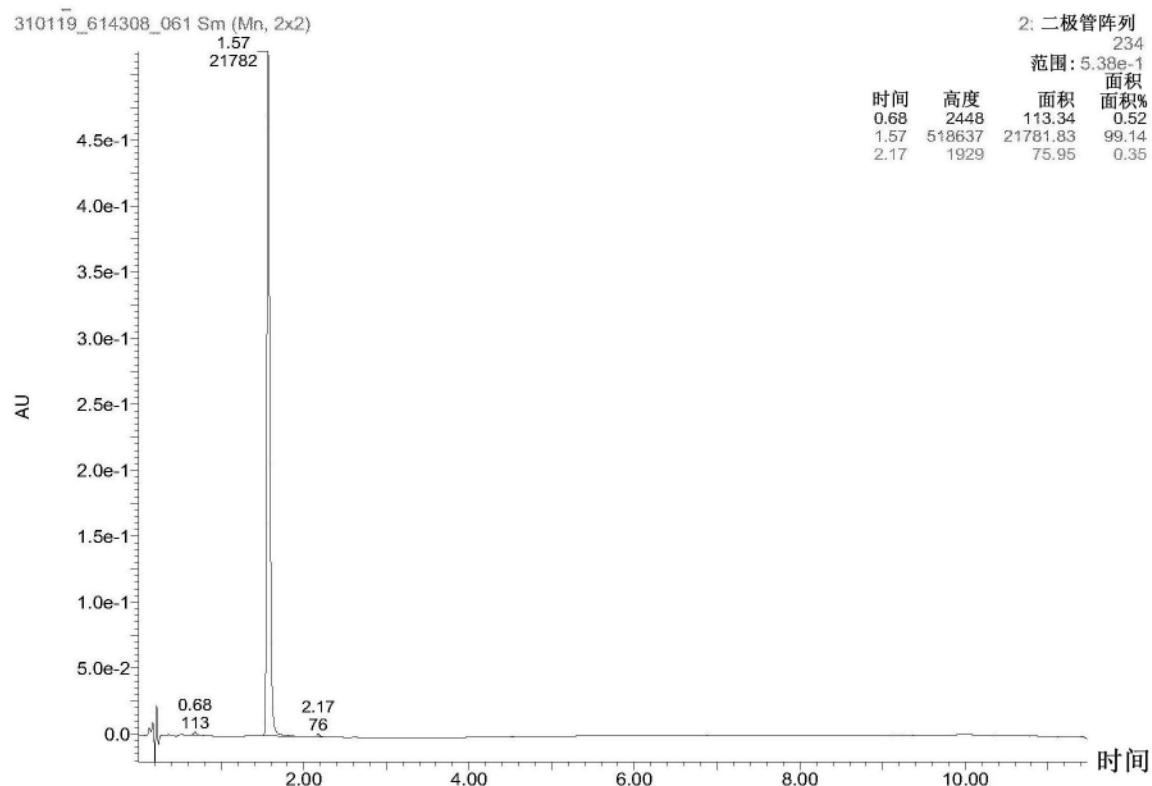


图13

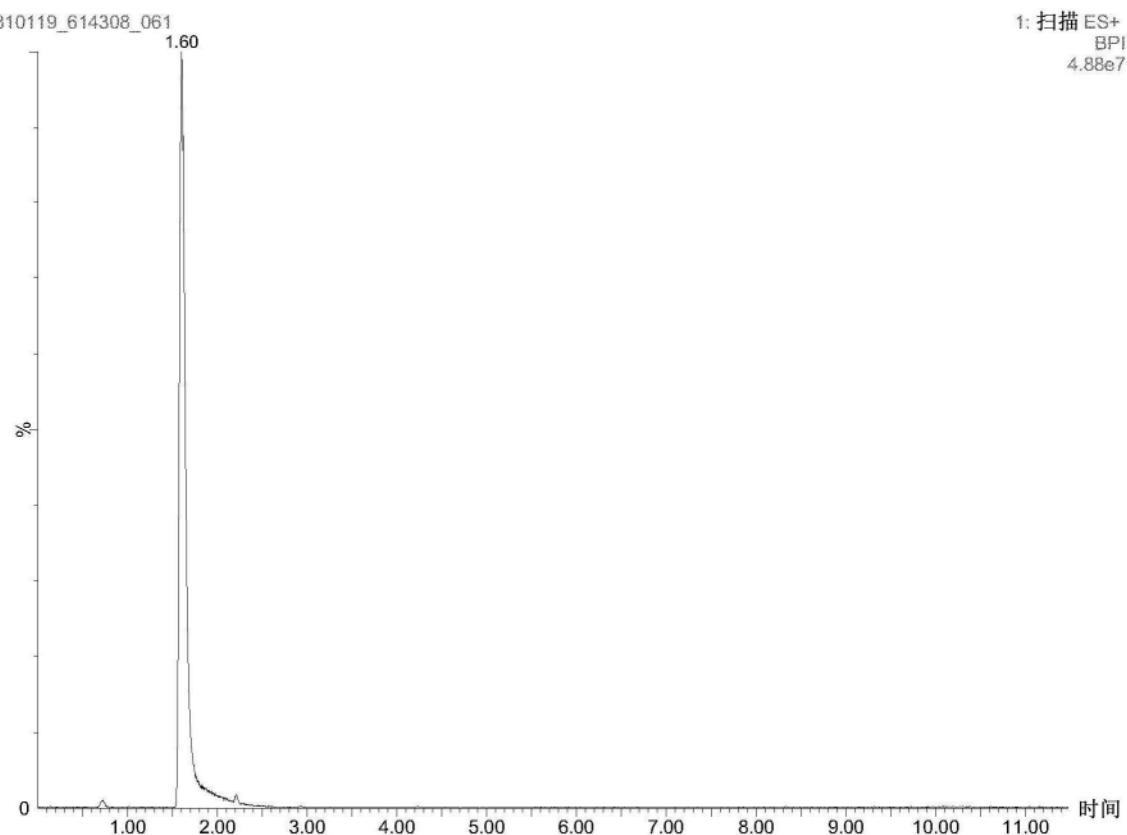


图14

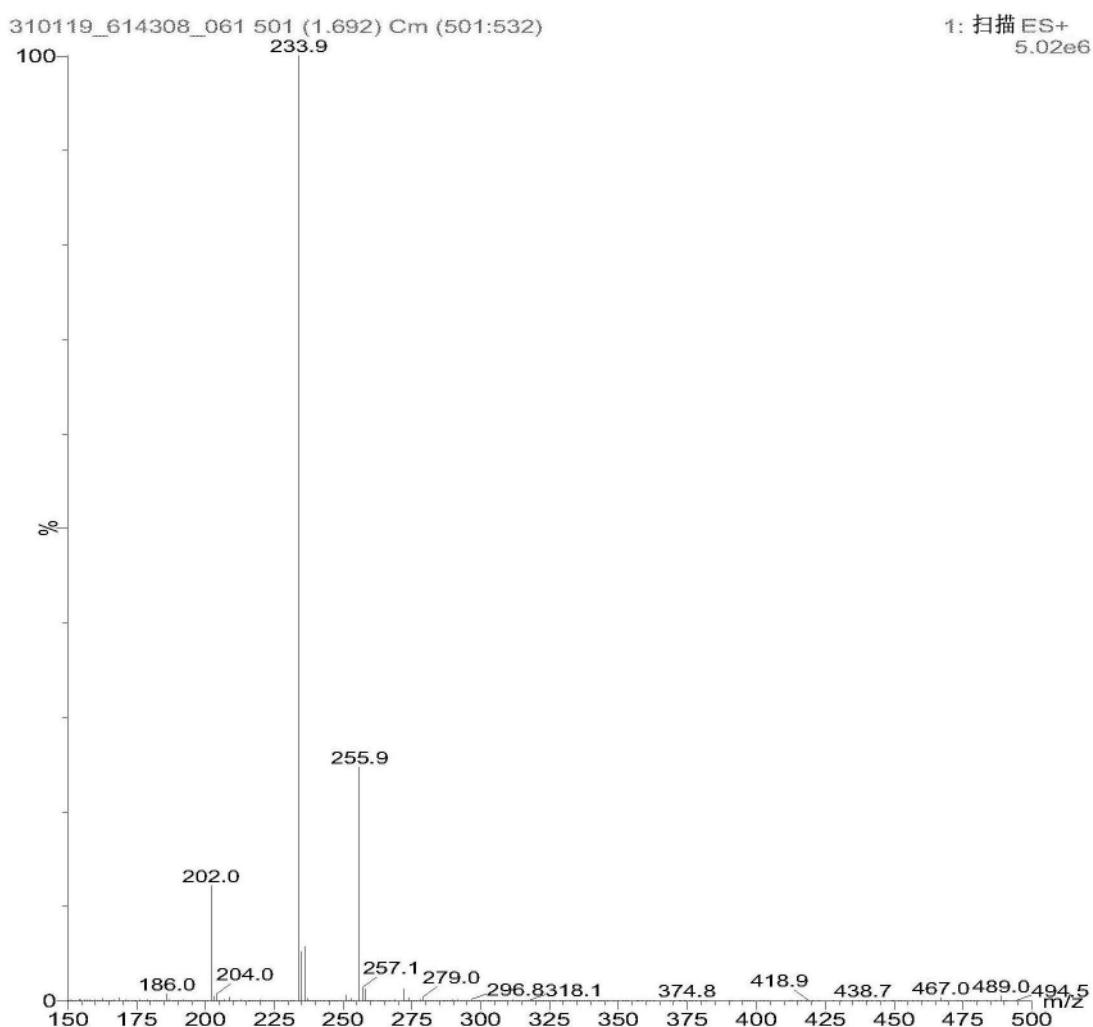


图15

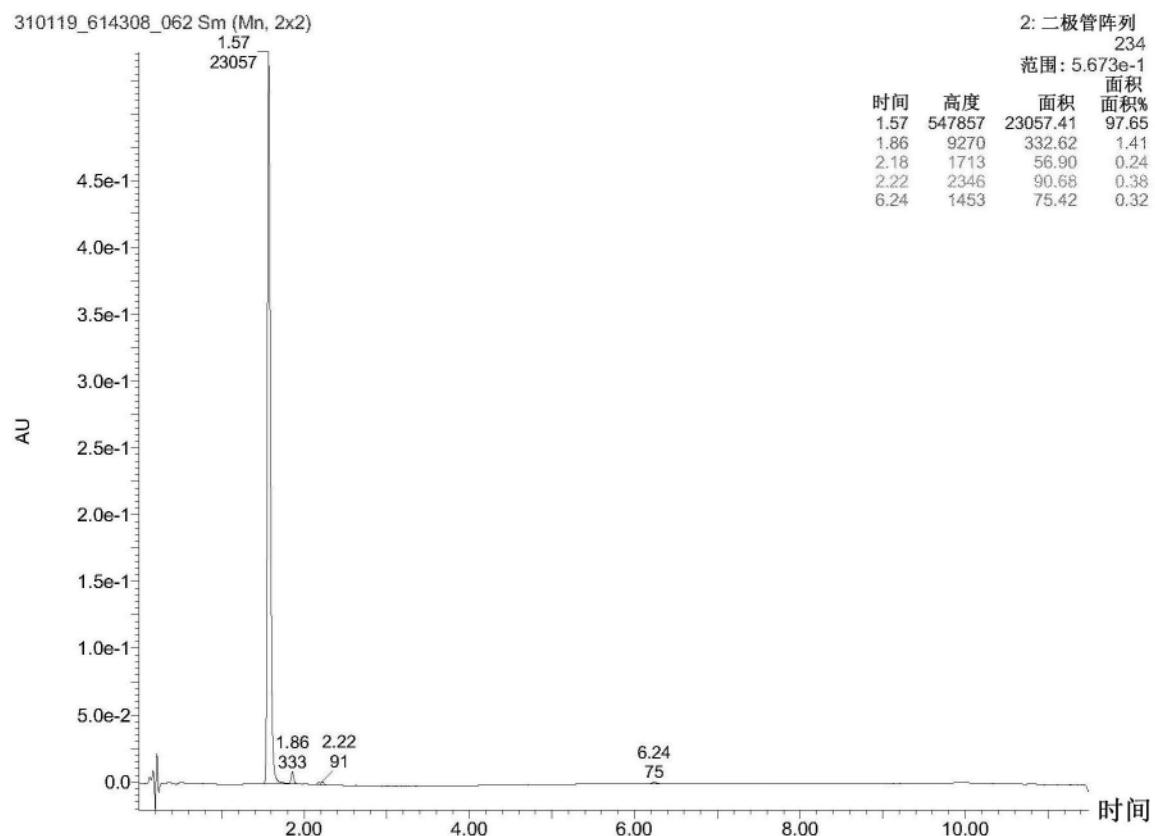


图16

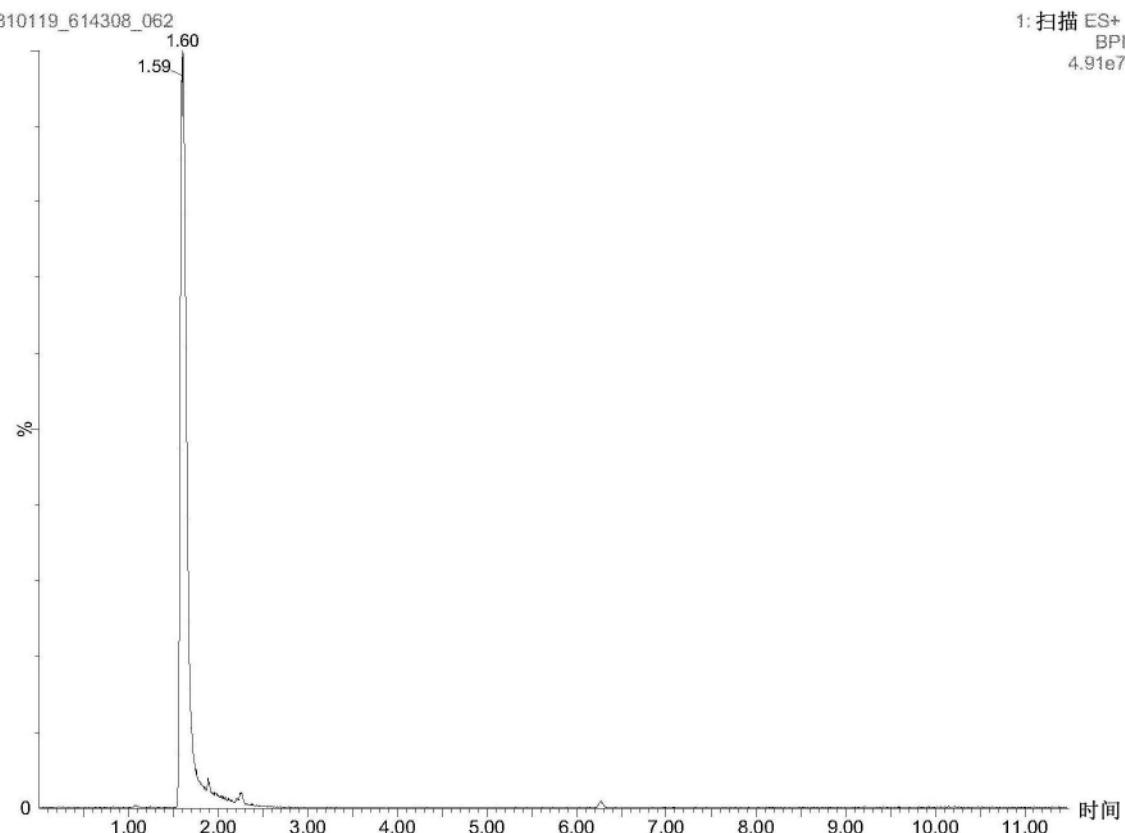


图17

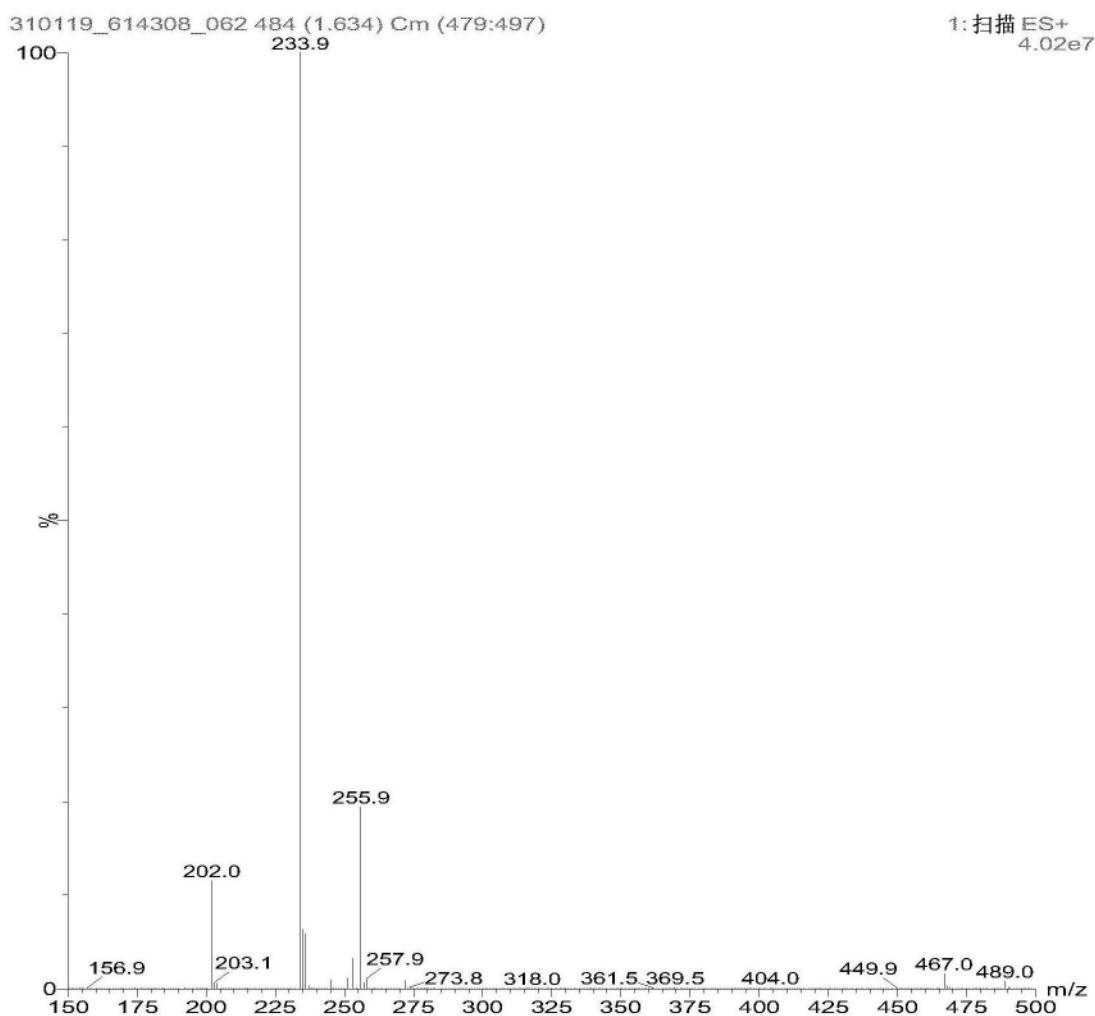


图18

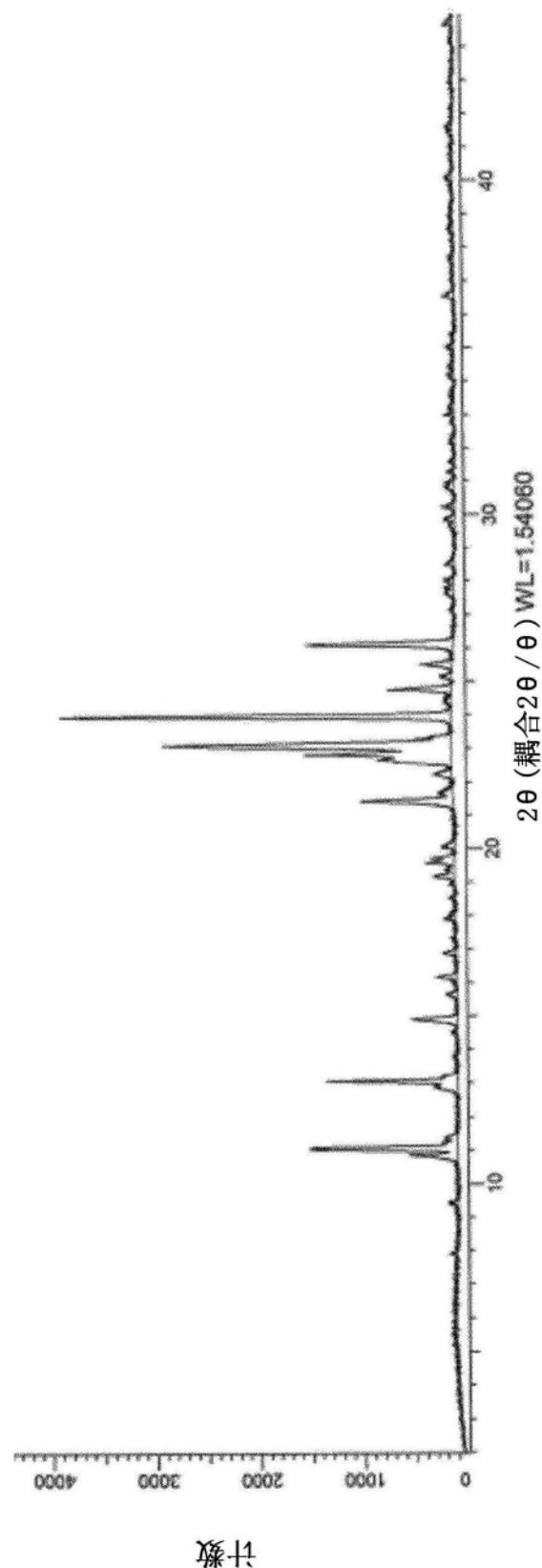


图19

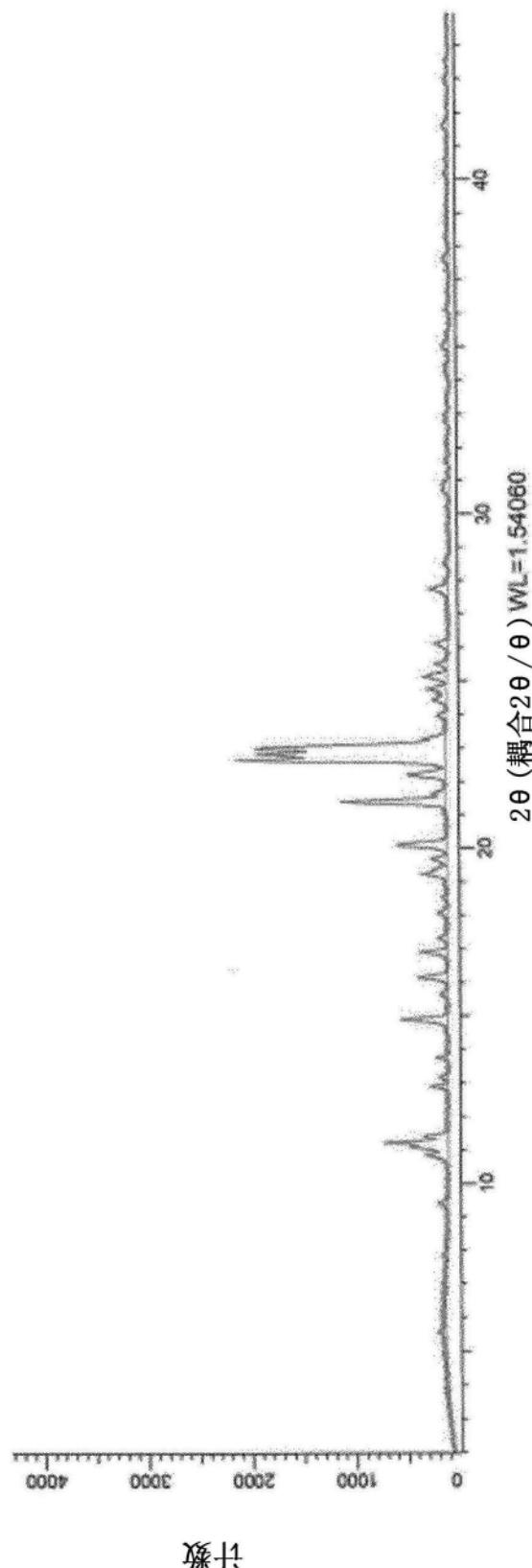


图20

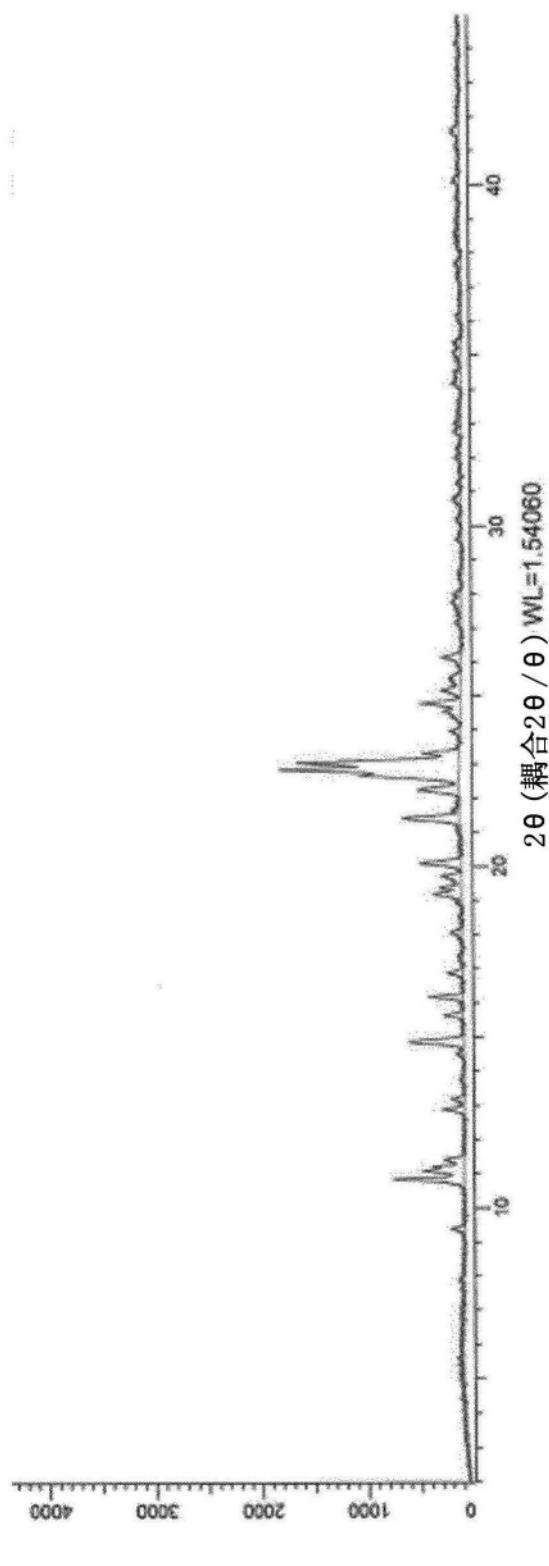
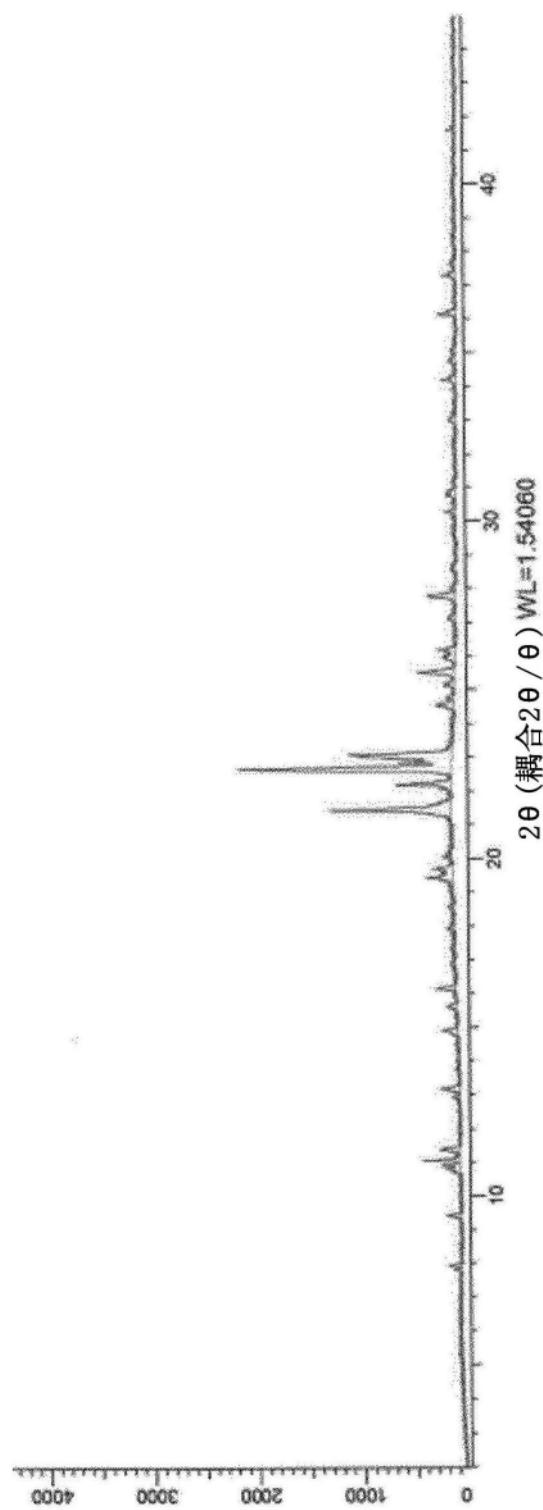


图21



计数

图22

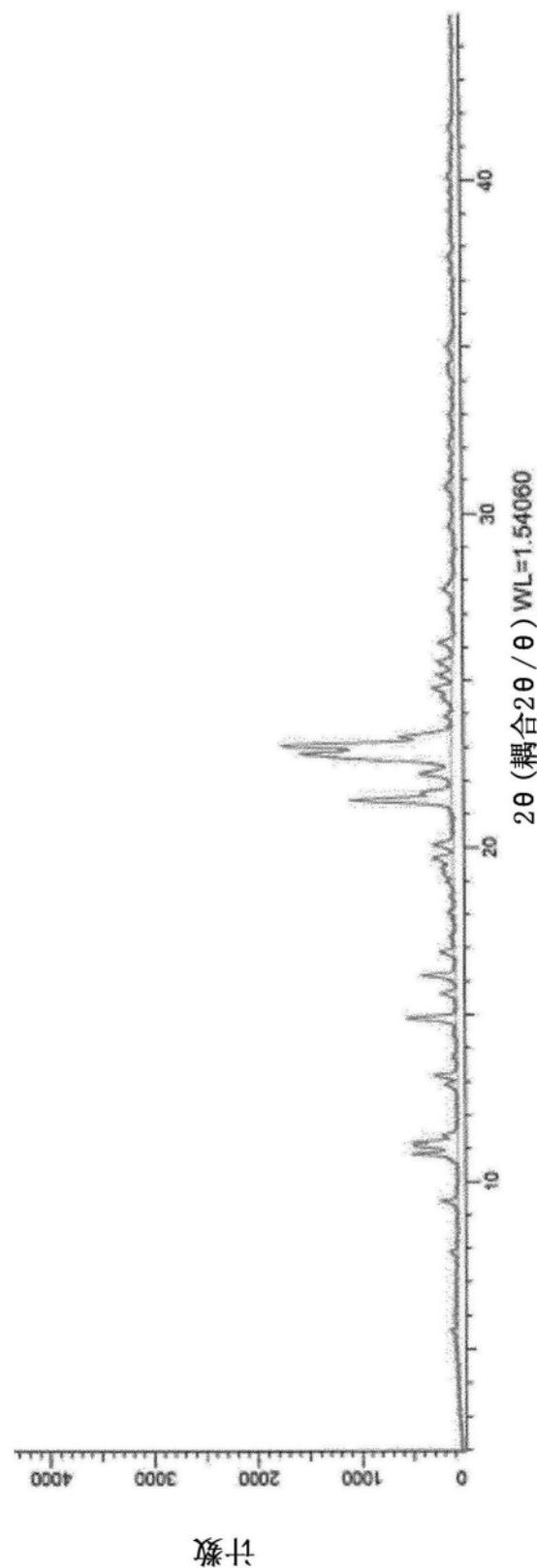


图23

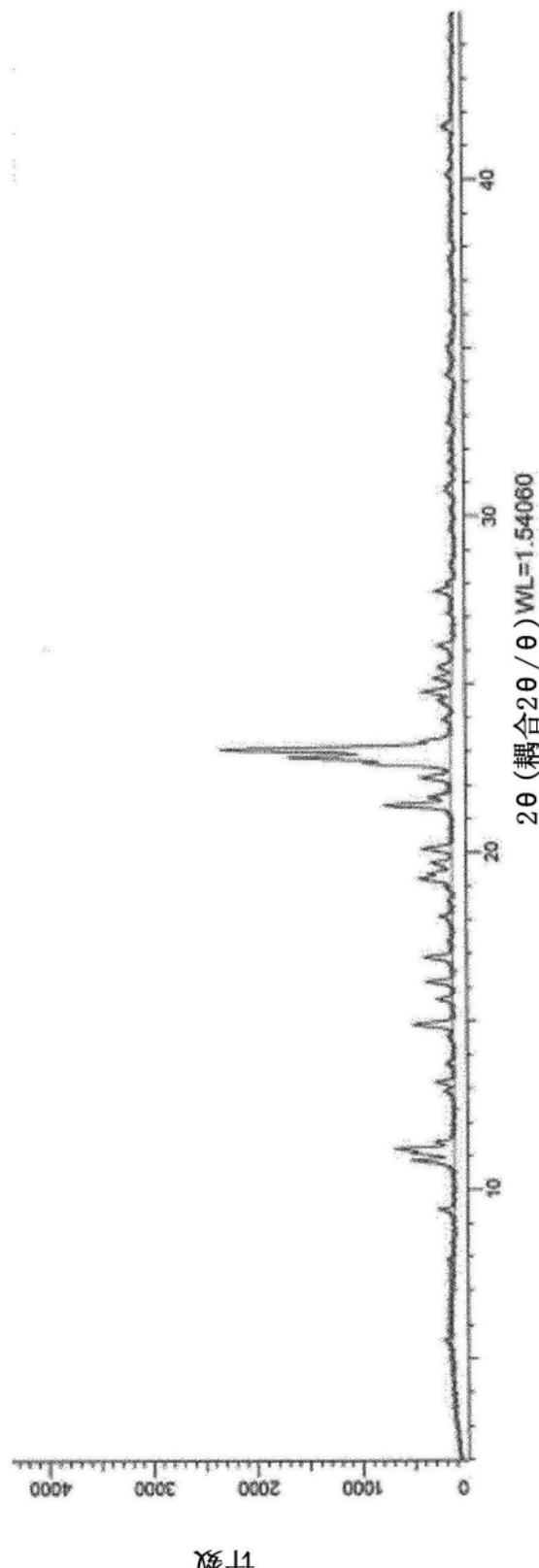
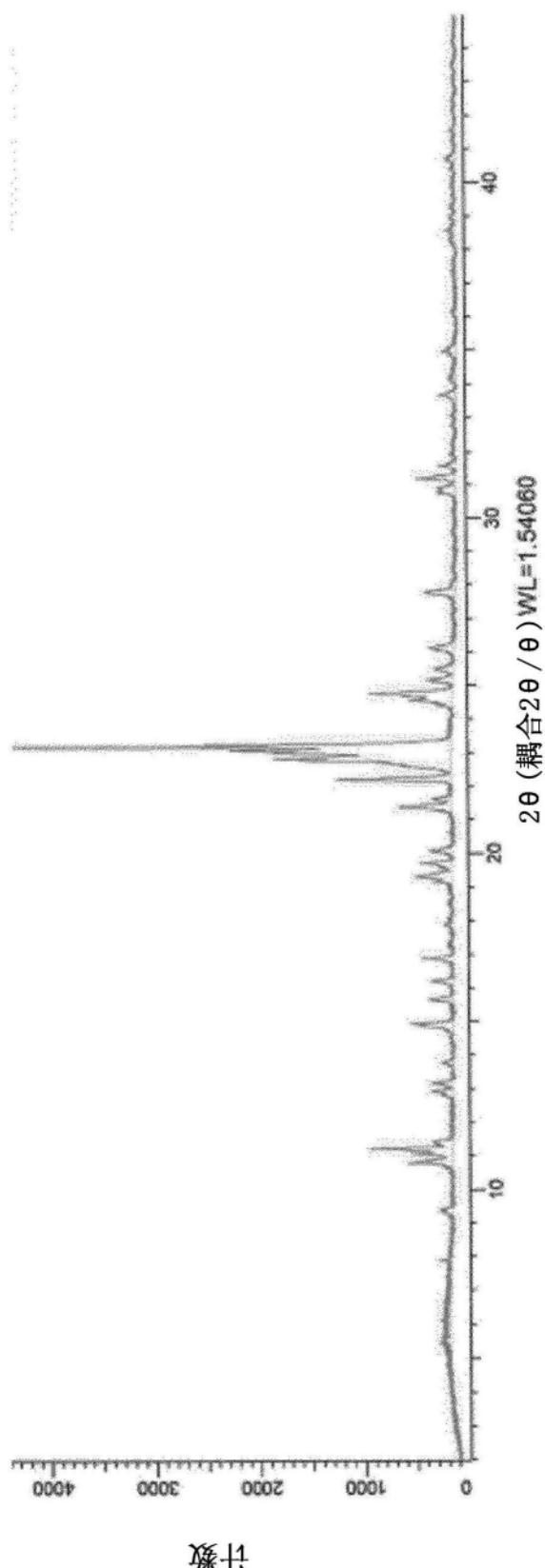


图24



计数

图25