



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113365616 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(21) 申请号 201980083477.1

S·平乔夫斯基 J·K·特里默

(22) 申请日 2019.10.17

E·托雷

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

62/747080 2018.10.17 US

62/771570 2018.11.26 US

代理人 罗文锋 彭昶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2021.06.16

A61K 31/05 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/122 (2006.01)

PCT/US2019/056836 2019.10.17

A61P 25/28 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/081879 EN 2020.04.23

(71) 申请人 PTC医疗公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 A·W·欣曼 C·R·霍尔斯特

A·米内拉 P·莫拉尔德

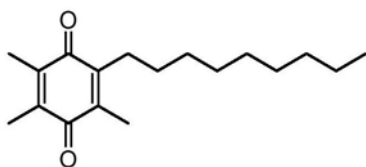
权利要求书4页 说明书33页 附图35页

(54) 发明名称

用于抑制和治疗 α-突触核蛋白病、tau蛋白病及其他疾病的2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮

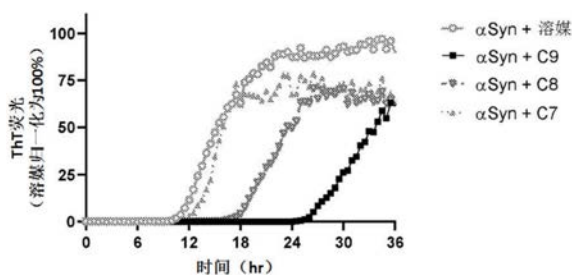
(57) 摘要

本发明公开了治疗或抑制选自由以下组成的组的疾病的方法: α-突触核蛋白病、tau蛋白病、ALS、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤, 所述方法包含向有此需要的受试者施用治疗有效量的下式化合物:

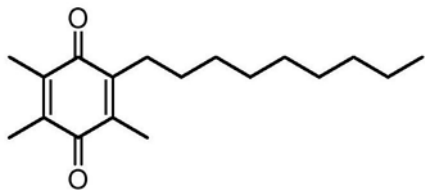


或其氢醌形式;

或其溶剂化物或水合物。



1. 治疗或抑制选自自由以下组成的组的疾病的方法： $\alpha$ -突触核蛋白病 ( $\alpha$ -共核蛋白病,  $\alpha$ -synucleinopathy)、tau蛋白病 (tauopathy)、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤, 所述方法包含对有此需要的受试者施用治疗有效量的下式化合物:



或其氢醌形式;或其溶剂化物或水合物。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述化合物不为溶剂化物或水合物。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述化合物为所述醌形式。

4. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述化合物为所述氢醌形式。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制 $\alpha$ -突触核蛋白病。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述 $\alpha$ -突触核蛋白病选自自由以下组成的组: 帕金森病 (Parkinson's Disease), 帕金森病痴呆 (PDD), 多系统萎缩症 (MSA), 额颞叶痴呆, 路易体痴呆 (Dementia with Lewy Bodies, DLB), 高雪氏病 (Gaucher's disease, GD), 神经退行性变伴脑铁沉积症 (NBIA), 和神经轴索营养不良 (PLA2G6相关神经退行性疾病)。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述帕金森病是遗传性的。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述帕金森病是特发性的。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制tau蛋白病。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述tau蛋白病选自自由以下组成的组: 阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease), 拳击性痴呆, 关岛型肌萎缩性侧索硬化-帕金森综合征-痴呆 (Guam ALS/PD), 皮克病 (Pick Disease), 嗜银颗粒性痴呆 (Argyrophilic grain dementia), 尼曼匹克氏病C型 (Niemann-Pick type C), 亚急性硬化性全脑炎 (SSPE), 进行性核上性麻痹 (PSP), 多系统萎缩症 (MSA), 皮质基底神经节变性 (Corticobasoganglionic degeneration), 额颞叶痴呆合并帕金森综合征17型 (FTDP-17), 脑炎后帕金森综合征 (PEP), 和常染色体隐性遗传性帕金森综合征 (Autosomal recessive Parkinsonism)。

11. 根据权利要求1-4任一项所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制阿尔茨海默氏病。

12. 根据权利要求1-4任一项所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制帕金森病。

13. 根据权利要求1-4任一项所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制外伤性脑损伤。

14. 根据权利要求1-4任一项所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制缺血再灌注相关损伤。

15. 根据权利要求1-4任一项所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制中风。

16. 根据权利要求1-4任一项所述的方法, 其中所述方法用于治疗或抑制肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)。

17. 根据权利要求1-16任一项所述的方法, 其中所述方法用于治疗所述疾病。

18. 根据权利要求1-16任一项所述的方法, 其中所述方法用于抑制所述疾病。

19. 根据权利要求1-18任一项所述的方法,其中所述化合物是口服施用。
20. 根据权利要求1-18任一项所述的方法,其中所述化合物是静脉内施用。
21. 2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的无水物的多晶型物,其中所述多晶型物的粉末X-射线衍射图包含至少在以下角位置处的特征峰:4.10、12.12和16.14,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。
22. 根据权利要求21所述的多晶型物,其包含至少在以下角位置处的特征峰:4.10、11.77、12.12和16.14,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。
23. 根据权利要求21所述的多晶型物,其包含至少在以下角位置处的特征峰:4.10、11.77、12.12、16.14和22.41,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。
24. 根据权利要求21-23任一项所述的多晶型物,其中所述角位置可变化 $\pm 0.1$ 。
25. 根据权利要求21-23任一项所述的多晶型物,其中所述角位置可变化 $\pm 0.05$ 。
26. 根据权利要求21-25任一项所述的多晶型物,其中所述多晶型物具有基本上如图5、11、14和16中任一所示的粉末X-射线衍射图。
27. 根据权利要求21-26任一项所述的多晶型物,其具有基本上如图7所示的差示扫描量热法(DSC)热分析图。
28. 根据权利要求21-27任一项所述的多晶型物,其中DSC热分析图在约47°C至约53°C处具有单个吸热峰。
29. 根据权利要求21-28任一项所述的多晶型物,其具有基本上如图8所示的热重分析(TGA)热分析图。
30. 根据权利要求21-29任一项所述的多晶型物,其具有基本上如图6所示的<sup>1</sup>HNMR谱。
31. 组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物,其中至少约95摩尔%的所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮是所述多晶型物,不含任何溶剂、载体或辅料。
32. 组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物,其中至少约99摩尔%的所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮是所述多晶型物,不含任何溶剂、载体或辅料。
33. 组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31或32所述的组合物,其中通过HPLC测定,所述组合物的至少约95% a/a是所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮,不含任何溶剂、载体或辅料。
34. 组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31或32所述的组合物,其中通过HPLC测定,所述组合物的至少约99% a/a是所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮,不含任何溶剂、载体或辅料。
35. 组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-34任一项所述的组合物,其中所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的效价(或含量)(potency)是至少约95%。
36. 组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-34任一项所述的组合物,其中所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的效价(或含量)是至少约99%。
37. 组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-36任一项所

述的组合物,其中所述多晶型物以多个粒子形式存在,其中所述粒子的D90:D10之比小于约11:1。

38.组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-36任一项所述的组合物,其中所述多晶型物以多个粒子形式存在,其中所述粒子的D90:D10之比小于约7:1。

39.组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-38任一项所述的组合物,其中所述多晶型物通过包含约75-85%IPA/水的溶剂进行重结晶。

40.组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-39任一项所述的组合物,其中所述多晶型物通过包含约80-85%IPA/水的溶剂进行重结晶。

41.组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-39任一项所述的组合物,其中所述多晶型物通过包含约85%IPA/水的溶剂进行重结晶。

42.药物组合物,其包含权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-41任一项所述的组合物,以及药学上可接受的溶剂、载体或辅料;或药物组合物,其采用权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-41任一项所述的组合物,以及药学上可接受的溶剂、载体或辅料制备。

53.治疗或抑制 $\alpha$ -突触核蛋白病( $\alpha$ -synucleinopathy)、tau蛋白病(tauopathy)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、外伤性脑损伤、或缺血再灌注相关损伤的方法,其包含对此需要的个体施用治疗有效量的权利要求21-30任一项所述的多晶型物、或权利要求31-42任一项所述的组合物。

54.从组合物中重结晶2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的方法,所述方法包含:

a)使所述组合物与IPA和水接触,以使得在约40-45°C的温度下,所得IPA与水之比为约75-87%异丙醇(IPA)/25-13%水(v:v);

b)将所述混合物冷却至约32°C;和

c)从所述混合物中过滤所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮。

55.根据权利要求54所述的方法,其中步骤(a)包含:

a1)使所述组合物与IPA接触;

a2)将所述混合物加热至约40-45°C;和

a3)向所述混合物中加入水,以使IPA与水之比为约75-85%IPA:25-15%水(v:v)。

56.根据权利要求54所述的方法,其中步骤(a)包含搅拌以使所述组合物溶解。

57.根据权利要求54-56任一项所述的方法,其中IPA:水之比为约80-85%IPA:20-15%水(v:v)。

58.根据权利要求54-56任一项所述的方法,其中IPA:水之比为约85%IPA:15%水(v:v)。

59.根据权利要求54-58任一项所述的方法,其中步骤(a3)包含使所述混合物的所述温度恢复至约40-45°C。

60.根据权利要求54-58任一项所述的方法,其包含在步骤(a)之后对所述混合物进行抛光过滤。

61.根据权利要求54-59任一项所述的方法,其中步骤(b)包含在约2-10小时内冷却至

约32℃。

62. 根据权利要求54-59任一项所述的方法,其中步骤(b)包含在约6小时内冷却至约32℃。

63. 根据权利要求54-61任一项所述的方法,其中所述方法包含步骤(b)之后的步骤(b1),包括将所述混合物在约32℃下保持约2-24小时。

64. 根据权利要求54-61任一项所述的方法,其中所述方法包含步骤(b)之后的步骤(b1),包括将所述混合物在约32℃下保持约6小时。

65. 根据权利要求54-63任一项所述的方法,如果存在,所述方法包含步骤(b)或步骤(b1)之后的步骤(b2),包括将所述混合物冷却至约0℃。

66. 根据权利要求54-63任一项所述的方法,其中步骤(b2)包含将所述混合物在约3-24小时内冷却至约0℃。

67. 根据权利要求64-65任一项所述的方法,其中步骤(b2)进一步包含将所述混合物在约0℃下保持约1小时。

68. 组合物,其包含根据权利要求54-67任一项制备的2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮。

69. 制备药物组合物的方法,其包含将权利要求21-30任一项所述的多晶型物或权利要求31-42或68任一项所述的组合物转化为液体或乳液形式。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述液体或乳液形式以口服溶液、液体灌装胶囊、或可注射溶液提供。

71. 根据权利要求69或70制备的药物组合物。

72. 2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的亚稳态熔融无定形形式,其XRPD图基本上如图31所示。

## 用于抑制和治疗 $\alpha$ -突触核蛋白病、tau蛋白病及其他疾病的2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮

[0001] 本申请要求并享有于2018年10月17日提交的、发明名称为“2,3,5-TRIMETHYL-6-NONYLCYCLOHEXA-2,5-DIENE-1,4-DIONE FOR SUPPRESSING AND TREATING ALZHEIMER'S DISEASE AND OTHER DISORDERS”的美国临时申请号62/747,080以及于2018年11月26日提交的、发明名称为“2,3,5-TRIMETHYL-6-NONYLCYCLOHEXA-2,5-DIENE-1,4-DIONE FOR SUPPRESSING AND TREATING ALZHEIMER'S DISEASE AND OTHER DISORDERS”的美国临时申请号62/771,570的优先权,此两项临时申请的内容通过引用其全文并入本申请,用于所有目的。

### 发明背景

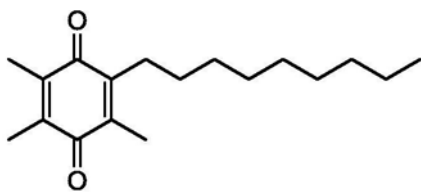
[0002] 美国公开号2007/0072943记载了某些醌类化合物,以及治疗某些线粒体疾病的方法。美国公开号2010/0063161记载了化合物2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮,以及治疗广泛性发育障碍和注意力缺陷多动障碍(ADHD)的方法。

[0003] 需要用于治疗或抑制某些疾病的改进方法,所述疾病包括 $\alpha$ -突触核蛋白病( $\alpha$ -共核蛋白病, $\alpha$ -synucleinopathies)、tau蛋白病(tauopathies)、ALS、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤。进一步需要的是与身体其他部位(例如血浆)相比具有优异的大脑渗透性和/或优异的分配进入大脑的能力的化合物。

[0004] 此外,需要可用于药物组合物的2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮及其粒子形式的稳定多晶型物;药物组合物的制备;以及用于治疗或抑制疾病的方法,包括用于治疗或抑制 $\alpha$ -突触核蛋白病、tau蛋白病、ALS、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤的方法。

### 发明摘要

[0005] 一方面,本发明涉及治疗或抑制选自以下组成的组的疾病的方法: $\alpha$ -突触核蛋白病( $\alpha$ -共核蛋白病)、tau蛋白病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤,所述方法包含向有此需要的受试者施用治疗有效量的下式化合物:

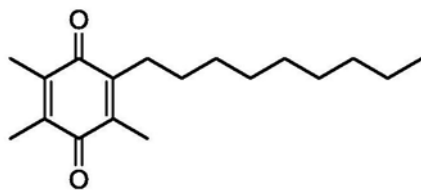


或其氢醌形式;或其溶剂化物或水合物。在一些实施方案,

所述化合物不为溶剂化物或水合物。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物为所述醌形式。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物为所述氢醌形式。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制 $\alpha$ -突触核蛋白病。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述 $\alpha$ -突触核蛋白病选自以下组成的组:帕金森病,帕金森病痴呆(Parkinson's Disease with dementia,PDD),多系统萎缩症(MSA),额颞叶痴呆,路易体痴呆(Dementia with Lewy Bodies,DLB),高雪氏病(Gaucher's disease,GD),神经退行性变伴脑铁沉积症(NBIA),和神经轴索营养不良(neuroaxonal

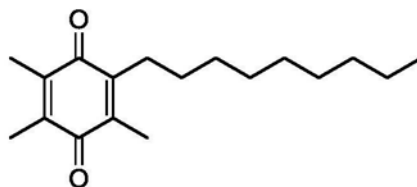
dystrophies, PLA2G6相关神经退行性疾病)。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述帕金森病是遗传性的。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述帕金森病是特发性的。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,用于抑制或治疗帕金森病的所述方法是其中所述患者在以下一种或多种基因中具有突变:MAPT(微管相关蛋白tau),PRKN(帕金蛋白),PINK1(PINK1),LRRK2(富含亮氨酸的重复激酶2),GBA(葡糖脑苷脂酶),SNCA( $\alpha$ 突触核蛋白),PARK7(DJ-1),和/或UCHL1(泛素羧基末端酯酶L1)。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制tau蛋白病。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述tau蛋白病选自由以下组成的组:阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease),拳击性痴呆(dementia pugilistica),关岛型肌萎缩性侧索硬化-帕金森综合征-痴呆(Guam ALS/PD),皮克病(Pick Disease),嗜银颗粒性痴呆(Argyrophilic grain dementia),尼曼匹克氏病C型(Nieman-Pick type C),亚急性硬化性全脑炎(SSPE),进行性核上性麻痹(PSP),多系统萎缩症(MSA),皮质基底神经节变性(Corticobasoganglionic degeneration),额颞叶痴呆合并帕金森综合征17型(Frontotemporal dementia with parkinsonism-17,FTDP-17),脑炎后帕金森综合征(Postencephalitic Parkinsonism,PEP),和常染色体隐性遗传性帕金森综合征(Autosomal recessive Parkinsonism)。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制阿尔茨海默氏病。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制帕金森病。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制外伤性脑损伤。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制缺血再灌注相关损伤。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制中风。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗或抑制肌萎缩性侧索硬化症(ALS)。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于治疗所述疾病。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法用于抑制所述疾病。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是口服施用。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是静脉内施用。

[0006] 另一方面,本发明涉及治疗或抑制选自由以下组成的组的疾病的方法:阿尔茨海默氏病、帕金森病、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤,所述方法包含对有此需要的受试者施用治疗有效量的下式化合物:



或其氢醌形式;或其溶剂化物或水合物。在一些实

施方案,所述化合物是:



或其氢醌形式。在一些实施方案,包

括任一前述实施方案,所述化合物为所述醌形式。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物为所述氢醌形式。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗阿尔茨海默氏病。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗帕金森病。在一些实施方案,用于抑制或治

疗帕金森病的方法包括治疗或抑制特发性帕金森病。在一些实施方案,用于抑制或治疗帕金森病的方法包括治疗或抑制家族性(即,遗传性)帕金森病。在一些实施方案,用于抑制或治疗帕金森病的方法是其中所述患者在以下一种或多种基因中具有突变:MAPT(微管相关蛋白tau),PRKN(帕金蛋白),PINK1(PINK1),LRRK2(富含亮氨酸的重复激酶2),GBA(葡萄糖脑苷脂酶),SNCA( $\alpha$ 突触核蛋白),PARK7(DJ-1),和/或UCHL1(泛素羧基末端酯酶L1)。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗外伤性脑损伤。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗缺血再灌注相关损伤。在一些实施方案,所述缺血再灌注相关损伤是中风。在一些实施方案,所述缺血再灌注相关损伤是缺血再灌注相关视网膜损伤。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是口服施用。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是注射施用。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是静脉内施用。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法是抑制所述疾病的方法。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法是治疗所述疾病的方法。

[0007] 另一方面,本发明涉及2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的无水物的多晶型物,其中所述多晶型物的粉末X-射线衍射图包含至少在以下角位置处的特征峰:4.10、12.12和16.14,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。在一些实施方案,采用Cu K $\alpha$ 1源,1.540598 Å的波长和23-25°C的温度来得到数据。在一些实施方案,所述多晶型物包含至少在以下角位置处的特征峰:4.10、11.77、12.12和16.14,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。在一些实施方案,所述多晶型物包含至少在以下角位置处的特征峰:4.10、11.77、12.12、16.14和22.41,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。在一些或任一实施方案,所述多晶型物的粉末X-射线衍射图包含至少在以下角位置之一的特征峰:4.10、11.77、12.12、16.14和22.41,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。在一些或任一实施方案,所述多晶型物的粉末X-射线衍射图包含至少在以下角位置的两个位置处的特征峰:4.10、11.77、12.12、16.14和22.41,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。在一些或任一实施方案,所述多晶型物的粉末X-射线衍射图包含至少在以下角位置的两个位置处的特征峰:4.10、11.77、12.12和16.14,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。在一些或任一实施方案,所述多晶型物的粉末X-射线衍射图包含至少在以下角位置的两个位置处的特征峰:4.10、12.12和16.14,其中所述角位置可变化 $\pm 0.2$ 。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述角位置可变化 $\pm 0.1$ 。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述角位置可变化 $\pm 0.05$ 。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物具有基本上如图5、11、14和16中任一所示的粉末X-射线衍射图。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物具有基本上如图7所示的差示扫描量热法(DSC)热分析图。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,DSC热分析图在约47°C至约53°C处具有单个吸热峰。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,DSC热分析图在约49°C至约53°C处具有单个吸热峰。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,DSC热分析图在约50°C至约52°C处具有单个吸热峰。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,DSC热分析图在约50.5°C处具有单个吸热峰。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物具有基本上如图8所示的热重分析(TGA)热分析图。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物具有基本上如图6所示的<sup>1</sup>H NMR谱。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,至少约95摩尔%的所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮是所述多晶型物,不含任何溶剂、载体或辅料。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,至少约99摩尔%的所述2,3,5-三甲

基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮是所述多晶型物,不含任何溶剂、载体或辅料。

在一些实施方案,包括任一前述实施方案,通过HPLC测定,所述组合物的至少约95%a/a是所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮,不含任何溶剂、载体或辅料。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,通过HPLC测定,所述组合物的至少约99%a/a是所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮,不含任何溶剂、载体或辅料。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的效价(或含量)(potency)是至少约95%。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的效价(或含量)是至少约99%。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物以多个粒子形式存在,其中所述粒子的D90:D10之比小于约11:1。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物以多个粒子形式存在,其中所述粒子的D90:D10之比小于约7:1。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物通过包含约75-85%IPA/水的溶剂进行重结晶。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物通过包含约80-85%IPA/水的溶剂进行重结晶。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述多晶型物通过包含约85%IPA/水的溶剂进行重结晶。

[0008] 另一方面,本发明涉及药物组合物,其包含本发明所述的多晶型物、或本发明所述的组合物,以及药学上可接受的溶剂、载体或辅料;或药物组合物,其采用本发明所述的多晶型物、或本发明所述的组合物,以及药学上可接受的溶剂、载体或辅料制备。

[0009] 另一方面,本发明涉及治疗或抑制 $\alpha$ -突触核蛋白病( $\alpha$ -synucleinopathy)、tau蛋白病(tauopathy)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、外伤性脑损伤、或缺血再灌注相关损伤的方法,其包含对此需要的个体施用治疗有效量的本发明所述的多晶型物、或本发明所述的组合物。

[0010] 另一方面,本发明涉及从组合物中重结晶2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的方法,所述方法包含:a)使所述组合物与IPA和水接触,以使得在约40-45°C的温度下,所得IPA与水之比为约75-87%异丙醇(IPA)/25-13%水(v:v);b)将所述混合物冷却至约32°C;和c)从所述混合物中过滤所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮。在一些实施方案,步骤(a)包含:a1)使所述组合物与IPA接触;a2)将所述混合物加热至约40-45°C;和a3)向所述混合物中加入水,以使IPA与水之比为约75-85%IPA:25-15%水(v:v)。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,步骤(a)包含搅拌以使所述组合物溶解。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,IPA:水之比为约80-85%IPA:20-15%水(v:v)。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,IPA:水之比为约85%IPA:15%水(v:v)。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,步骤(a3)包含使所述混合物的所述温度恢复至约40-45°C。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法包含在步骤(a)之后对所述混合物进行抛光过滤。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,步骤(b)包含在约2-10小时内冷却至约32°C。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,步骤(b)包含在约6小时内冷却至约32°C。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法包含步骤(b)之后的步骤(b1),包括将所述混合物在约32°C下保持约2-24小时。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法包含步骤(b)之后的步骤(b1),包括将所述混合物在约32°C下保持约6小时。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,如果存在,所述方法包含步骤(b)或(b1)之后的步骤(b2),包括将所述混合物冷却至约0°C。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,步骤(b2)包含

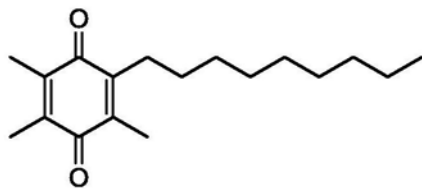
将所述混合物在约3-24小时内冷却至约0°C。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,步骤(b2)进一步包含将所述混合物在约0°C下保持约1小时。

[0011] 另一方面,本发明涉及组合物,其包含根据紧接前述段落所述方法制备的2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮。

[0012] 另一方面,本发明涉及制备药物组合物的方法,其包含将前述段落任一所述的多晶型物或前述段落任一所述的组合物转化为液体或乳液形式。在一些实施方案,所述药物组合物以口服溶液、液体灌装胶囊、或可注射溶液提供。本发明提供了根据所述这些方法制备的药物组合物。

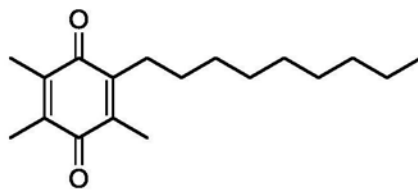
[0013] 另一方面,本发明涉及2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的亚稳态熔融无定形形式,其XRPD图基本上如图31所示。

[0014] 一方面,本发明涉及治疗或抑制选自以下组成的组的疾病的方法:阿尔茨海默氏病、帕金森病、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤,所述方法包含对此需要的受试者施用治疗有效量的下式化合物:



或其氢醌形式;或其溶剂化物或水合物。在一些实

施方案,所述化合物是:



或其氢醌形式。在一些实施方案,包

括任一前述实施方案,所述化合物为所述醌形式。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物为所述氢醌形式。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗阿尔茨海默氏病。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗帕金森病。在一些实施方案,用于抑制或治疗帕金森病的方法包括治疗或抑制特发性帕金森病。在一些实施方案,用于抑制或治疗帕金森病的方法包括治疗或抑制家族性(即,遗传性)帕金森病。在一些实施方案,用于抑制或治疗帕金森病的方法是其中所述患者在以下一种或多种基因中具有突变:MAPT(微管相关蛋白tau),PRKN(帕金森蛋白),PINK1(PINK1),LRRK2(富含亮氨酸的重复激酶2),GBA(葡萄糖脑苷脂酶),SNCA(α突触核蛋白),PARK7(DJ-1),和/或UCHL1(泛素羧基末端酯酶L1)。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗外伤性脑损伤。在一些实施方案,所述方法用于抑制或治疗缺血再灌注相关损伤。在一些实施方案,所述缺血再灌注相关损伤是中风。在一些实施方案,所述缺血再灌注相关损伤是缺血再灌注相关视网膜损伤。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是口服施用。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是注射施用。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述化合物是静脉内施用。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法是抑制所述疾病的方法。在一些实施方案,包括任一前述实施方案,所述方法是治疗所述疾病的方法。

[0015] 本发明所述的任何一种或多种化合物,包括所有前述化合物,均可用于组合物,所述组合物包含药学上可接受的载体、药学上可接受的辅料或药学上可接受的媒剂。在一些

实施方案,将所述组合物配制成为用于内用。可将本发明所述的任何一种或多种化合物,包括所有前述化合物,配制成单位剂量制剂。

[0016] 对于本发明所述的所有化合物、组合物、制剂和方法,当需要时,所述醌形式的任何化合物也可以其还原形式(氢醌)使用。即,本发明中作为环己二烯二酮类化合物(氧化的醌)形式列举的化合物亦可根据需要以其苯二酚(还原的氢醌)形式使用。

[0017] 对于本发明所述的所有化合物、组合物和制剂,以及使用本发明所述化合物或组合物或制剂的所有方法,所述化合物或组合物可包含所列组分或步骤,或者可“基本上由”所列组分或步骤“组成”,或者可“由”所列组分或步骤“组成”。即,过渡短语“包括”或“包含”可由过渡短语“基本上由...组成”或“基本由...组成”代替。或者,在一些或任一实施方案,过渡短语“包括”或“包含”可由过渡短语“由...组成”代替。当组合物被描述为“基本上由”所列组分“组成”时,则所述组合物包含所列组分,并且可包含基本上不影响所治疗疾病的其他组分,但除明确列出的那些组分外不包含基本上影响所治疗疾病的任何其他组分;或者,如果所述组合物确实包含除所列组分之外的、基本上会影响所治疗疾病的额外组分,则所述组合物不含足够浓度或量的所述基本上会影响所治疗疾病的额外组分。当方法被描述为“基本上由”所列步骤“组成”时,所述方法包含所列步骤,并且可包含基本上不影响所治疗疾病的其他步骤,但除明确列出的那些步骤外所述方法不包含基本上影响所治疗疾病的任何其他步骤。作为非限制性的具体实例,当组合物被描述为“基本上由”组分“组成”时,所述组合物可另外包含任何量的药学上可接受的载体、媒剂、辅料或稀释剂以及基本上不影响所治疗疾病的其他此类组分。

#### 附图简要说明

[0018] 图1A示出了在以亚化学计量比的化合物2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(“C9”)、2,3,5-三甲基-6-辛基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(“C8”)、2,3,5-三甲基-6-庚基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(“C7”)、或仅溶媒存在下重组人 $\alpha$ 突触核蛋白( $\alpha$ Syn)聚集的动力学。

[0019] 图1B示出了不存在(溶媒)或存在C9、C8或C7的情况下,在 $t=24$ 小时的原纤维化后, $\alpha$ 突触核蛋白( $\alpha$ Syn)的原纤维含量。基于相对的ThT荧光强度(在经溶媒处理的 $\alpha$ 突触核蛋白样品的平均值 $t=45.5$ hr时的终点值设置为100%)评估所述原纤维含量。

[0020] 图2示出了在孵育94小时后,溶媒、C9、C8或C7处理对Tau预形成的原纤维含量的影响。

[0021] 图3A示出了在不存在或存在C9、C8或C7共同处理的情况下,用RSL3处理的N27大鼠多巴胺能细胞中的核和聚集的 $\alpha$ 突触核蛋白。

[0022] 图3B示出了C9、C8或C7处理对N27细胞中RSL3诱导的 $\alpha$ 突触核蛋白聚集的影响。

[0023] 图4A和图4B示出了在C57BL/6小鼠的旷场运动试验中,C9给药剂量对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)抑制的垂直活性(分别为总垂直计数和垂直时间)的影响。

[0024] 图5示出了通过长扫描方法分析的原样材料(as-received material)(ID 1-1)的XRPD衍射图,即A型(Pattern)。

[0025] 图6示出了原样材料(ID 1-1)在MeOD中的 $^1\text{H}$  NMR谱。

[0026] 图7示出了原样材料(ID-1-1)的独立式DSC热分析图。

[0027] 图8示出了原样材料(ID-1-1)的TGA和DCS热分析图。

- [0028] 图9A(右下角标示出100 $\mu\text{m}$ 标尺)和图9B(右下角标示出20 $\mu\text{m}$ 标尺)分别示出了原样材料(ID-1-1)在100倍和400倍放大倍率下的显微图像。
- [0029] 图10示出了原样材料(ID-1-1)的DVS等温线图。
- [0030] 图11示出了与在DVS仪器中加湿循环后的固体的XRPD衍射图(顶部)相比,原样固体(ID-1-1)的XRPD衍射图,即A型(底部)。
- [0031] 图12示出了原样材料(ID-1-1)的HPLC色谱图。
- [0032] 图13示出了对ID-1-1进行热处理后的ID-10-1的DSC热分析图。
- [0033] 图14示出了与从热处理后回收的固体(ID-10-1)的XRPD衍射图(顶部)相比,原样材料(ID-1-1)的XRPD衍射图,即A型(底部)。
- [0034] 图15示出了稳定样品ID-4-1的HPLC色谱图。
- [0035] 图16示出了在75%RH和40 $^{\circ}\text{C}$ 下,一周后原样ID-1-1(底部)与固体形式稳定样品ID-4-1(顶部)的XRPD衍射图。
- [0036] 图17A(右下角标示出100 $\mu\text{m}$ 标尺)和图17B(右下角标示出20 $\mu\text{m}$ 标尺)分别示出了ID-4-1在100倍和400倍放大倍率下的显微图像。
- [0037] 图18示出了ID-38-1在25倍放大倍率下的显微图像,其中右下角标示出500 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0038] 图19示出了ID-38-1在100倍放大倍率下的显微图像,其中右下角标示出100 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0039] 图20示出了ID-38-1在400倍放大倍率下的显微图像,其中右下角标示出20 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0040] 图21示出了ID-38-2在25倍放大倍率下的显微图像,其中右下角标示出500 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0041] 图22示出了ID-38-2在100倍放大倍率下的显微图像,其中右下角标示出100 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0042] 图23A和图23B示出了ID-38-2在400倍放大倍率下的显微图像,其中右下角标示出20 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0043] 图24示出了在25倍放大倍率下,比较两个批料ID-38-1(顶部)和ID-38-2(底部)的显微图像,其中右下角标示出500 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0044] 图25示出了在100倍放大倍率下,比较两个批料ID-38-1(顶部)和ID-38-2(底部)的显微图像,其中右下角标示出100 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0045] 图26示出了在400倍放大倍率下,比较两个批料ID-38-1(顶部)和ID-38-2(底部)的显微图像,其中右下角标示出20 $\mu\text{m}$ 标尺。
- [0046] 图27和图28分别示出了材料实施例3A,制备例1和制备例2的代表性实验的粒度分布。
- [0047] 图29和图30分别示出了材料实施例3B,制备例1和制备例2的代表性实验的粒度分布。
- [0048] 图31是冷却至室温达5分钟后的液体C9的XRPD衍射图。
- [0049] 图32是较小压力条件下,温度循环实验的DSC热分析图。

发明详述

[0050] 本发明提供了用于治疗或抑制 $\alpha$ -突触核蛋白病( $\alpha$ -synucleinopathy)、tau蛋白病(tauopathy)、ALS、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤的化合物、组合物和方法。 $\alpha$ -突触核蛋白病是神经退行性疾病,其特征在于 $\alpha$ -突触核蛋白蛋白质聚集体在神经元、神经纤维或神经胶质细胞中异常聚集。tau蛋白病属于与人脑神经原纤维或胶质原纤维缠结中tau蛋白的病理性聚集有关的一类神经退行性疾病,例如阿尔茨海默氏病(参见,例如Cellular and Molecular Neurobiology (2018) 38:965-980)。如实施例所示,所要求保护的化合物已显示出减少 $\alpha$ -突触核蛋白的聚集体以及减少tau蛋白的聚集体的功效。不希望受到理论束缚,对于所要求保护的疾病,使药物渗透到大脑中可能是有益的,此外,与其他组织相比,使药物优先分配到大脑中可能是有益的。譬如,此举可减少脱靶和副作用。申请人惊奇地发现,与血浆相比,所要求保护的化合物具有优异的大脑渗透性以及所述化合物优异的分配进入大脑的能力。

[0051] 本发明进一步提供了化合物2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的固体形式,包含较高纯度以及具有优选特性(例如,更优选的粒子形态和粒度分布)的所述固体形式的组合物,以及制备所述化合物和组合物的方法。如在本发明详述、实验部分和本发明提供的附图中更详细示出的,所述组合物具有有益的性质,例如改善的纯度(例如较低的银含量),改善的处理特性(例如流动性),和改善的配制成药物的能力(例如改善的研磨能力)。与早期工艺相比,所述这些粒子具有良好的流动性和形态学特征。本发明粒子的使用便利了药物产品的生产制造,例如,胶囊灌装。此外,使用本发明粒子,可减少药物产品生产所需辅料的量,这在成本、时间和工艺效率方面具有优势。实际上,如果药物是粘性的或不容易流动,则可能需要更多的辅料来改善所述药物的处理。同样,如果需要对药物进行研磨,则由于研磨设备表面的损失,导致所述粘性物料将具有产量损失,并且研磨后的产品将形成更多或更难以破碎的附聚物。这些特性在药品生产的加工处理中是不可取的,并且在本发明所述工艺过程中得到了改善。

[0052] 除非另有说明,否则本发明所用的缩写在化学和生物学领域具有其常规含义。

[0053] 凡本发明提及“大约”或“约”值或参数,则包括(并描述)针对所述值或参数本身的变化。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0054] 除非另有说明,否则本发明使用的术语“约”和“大约”在与各种术语,例如组合物或剂型的成分的温度、剂量、量或重量百分比结合使用时是指,例如本领域普通技术人员所认可的温度、剂量、量或重量百分比,以提供与从所述指定温度、剂量、量或重量百分比得到的效果相同的效果。具体而言,术语“大约”和“约”,当在本发明中使用时,预期温度、剂量、量或重量百分比等在所述指定温度、剂量、量或重量百分比等的15%以内,10%以内,5%以内,4%以内,3%以内,2%以内,1%以内,或0.5%以内。

[0055] 除非上下文另有明确指出,否则本发明使用的术语“一个/一种(不定冠词“a”或“an”)”是指一个或多个或一种或多种。

[0056] “受试者”、“个体”或“患者”是指个体生物体,优选为脊椎动物,更优选为哺乳动物,最优选为人。

[0057] 采用本发明讨论的化合物和方法“治疗”疾病定义为,施用一种或多种本发明讨论的化合物,含或不含附加治疗剂,以减轻或消除所述疾病或所述疾病的一种或多种症状,或延缓所述疾病或所述疾病的一种或多种症状的进展,或减轻所述疾病或所述疾病的一种或

多种症状的严重程度。采用本发明讨论的化合物和方法“抑制”疾病定义为,施用一种或多种本发明讨论的化合物,含或不加附加治疗剂,以抑制所述疾病的临床表现或抑制所述疾病的不良症状表现。治疗与抑制之间的区别在于,治疗发生在受试者的疾病或病症的不良症状显现之后,而抑制发生在受试者的疾病或病症的不良症状显现之前。抑制可以是部分、基本上全部或全部。在一些实施方案,遗传筛选可用于鉴定处于患疾病风险的患者。然后,可将本发明公开的化合物和方法施用于有发展为所述疾病的临床症状的风险的无症状患者,从而抑制任何不良症状的出现。

[0058] 本发明所讨论的化合物的“治疗用途”定义为,使用本发明所讨论的一种或多种化合物来治疗或抑制本发明所定义的疾病或病症。化合物的“治疗有效量”是所述化合物的量,当将其施用于受试者时,所述量足以减轻或消除疾病或疾病的一种或多种症状,或延缓疾病或疾病的一种或多种症状的进展,或减轻疾病或疾病的一种或多种症状的严重程度,或抑制疾病的临床表现,或抑制疾病的不良症状的表现。治疗有效量可以一次或多次给药进行服用。

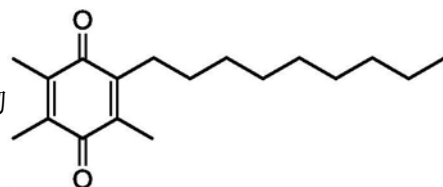
[0059] “2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮”和“C9”在本发明中可互换使用。

[0060] “2,3,5-三甲基-6-辛基环己-2,5-二烯-1,4-二酮”和“C8”在本发明中可互换使用。

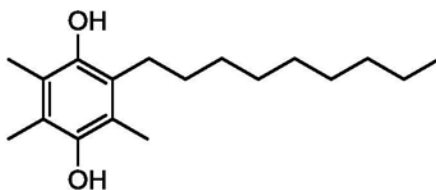
[0061] “2,3,5-三甲基-6-庚基环己-2,5-二烯-1,4-二酮”和“C7”在本发明中可互换使用。

[0062] “氢醌形式”表示当醌环的两个电子还原实现时,提供两个氧代基团向两个羟基基

团的净转化,所得到的化合物的形式。例如,所述醌化合物



的所述氢醌形式是以下化合物:



[0063] “ $\alpha$ 突触核蛋白”和“ $\alpha$ -突触核蛋白”在本发明中可互换使用。

[0064] 在一些实施方案,本发明化合物的描述还包括所有同位素,在一些实施方案,为本发明所有化合物的部分氘代或全氘代类似物。

[0065] 缺血再灌注相关损伤包括,但不限于,中风和缺血再灌注相关视网膜损伤。

[0066] “中风”包括缺血性中风(非限制性实例包括血栓性中风、栓塞性中风),出血性中风(非限制性实例包括脑内出血、蛛网膜下腔出血),和短暂性脑缺血发作。在一些实施方案,所述中风是缺血性中风。在一些实施方案,所述中风是出血性中风。在一些实施方案,所述中风是短暂性脑缺血发作。

[0067] 对于本发明权利要求书中描述的所有表征数据(例如,XRPD峰值、DSC、TGA、粒度分布等),在一些实施方案,所述数据是通过基本上如本发明所述进行的方法得到(例如,对于

XRPD、DSC和TGA,具体方法学参见实施例7)。“基本上如本发明所述”表示本领域技术人员将使用本领域普通技术人员公认的方法以提供与从所述指定方法得到的结果基本等同的结果。

### 药物制剂

[0068] 对于所要求保护的晶型,残留溶剂是在允许的范围内,使其非常适于配制成药物组合物。固态形式也易于通过结晶技术进行纯化。所要求保护的晶型既非吸湿性的,也非水合物/溶剂化物,这意味着就湿度暴露而言,其无需特殊处理。此外,由重结晶工艺过程产生的改进形态使得能够在生产期间更易于处理(例如,在本发明中更详细地描述的)。本发明所述化合物可通过与添加剂如药学上可接受的辅料、药学上可接受的载体和药学上可接受的媒剂一同配制而配制成药物组合物。合适的药学上可接受的辅料、载体和媒剂包括加工剂和药物递送改性剂以及增强剂,例如,在一些实施方案,包括磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、单糖类、二糖类、淀粉、明胶、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、右旋糖、羟丙基-β-环糊精、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡类、离子交换树脂类等,以及其任何两种或更多种的组合。其他合适的药学上可接受的辅料记载在“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Pub.Co.,New Jersey (1991),和“Remington:The Science and Practice of Pharmacy,”Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,20th edition (2003) and 21st edition (2005)中,其均通过引用并入本发明。

[0069] 药物组合物可包含单位剂量制剂,其中所述单位剂量是足以具有治疗作用的剂量。

[0070] 包含本发明化合物的药物组合物可以是适于预期给药方法的任何形式,在一些实施方案,包括溶液、悬浮液或乳液。液体载体通常用于制备溶液、悬浮液和乳液。在一些实施方案,预期用于实施本发明的液体载体包括水,盐水,药学上可接受的有机溶剂类,药学上可接受的油类或脂肪类等,以及其两种或更多种的混合物。液体载体可包含其他合适的药学上可接受的添加剂,例如增溶剂类、乳化剂类、营养剂类、缓冲剂类、防腐剂类、悬浮剂类、增稠剂类、黏度调节剂类、稳定剂类等。在一些实施方案,合适的有机溶剂类包括一元醇类例如乙醇,和多元醇类例如二醇类。在一些实施方案,合适的油类包括芝麻油、大豆油、椰子油、橄榄油、红花油、棉籽油等。对于肠胃外给药,载体亦可以是油性酯,例如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯等。本发明组合物亦可以是微粒、微胶囊、脂质体包囊等的形式,以及其任何两种或更多种的组合。

[0071] 可使用时间释放或控释递送系统,例如扩散控制基质系统或易蚀系统,如在以下内容中所述:Lee,“Diffusion-Controlled Matrix Systems”,pp.155-198 and Ron and Langer,“Erodible Systems”,pp.199-224,和“Treatise on Controlled Drug Delivery”,A.Kydonieus Ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York 1992。在一些实施方案,所述基质可以是可生物降解的材料,所述可生物降解的材料在一些实施方案中可通过水解或酶促切割(例如,通过蛋白酶)在原位和体内自发降解。在一些实施方案,所述递送系统可以是天然存在的或合成的聚合物或共聚物,在一些实施方案为水凝胶形式。具有可切割键的示例性聚合物包括聚酯类、聚原酸酯类、聚酸酐类、多糖类、聚(磷酸酯类)、聚酰胺类、聚氨酯类、聚(酰亚氨基碳酸酯类)和聚(磷脂类)。

[0072] 本发明化合物可根据需要,以含有常规无毒药学上可接受的载体、佐剂和媒剂的

剂量单位制剂,经肠内、口服、肠胃外、舌下、吸入(例如,以雾剂或喷雾剂方式)、直肠或局部进行给药。在一些实施方案,合适的给药方式包括口服、皮下、经皮、透粘膜、离子电渗疗法、静脉内、动脉内、肌内、腹膜内、鼻内(例如,通过鼻粘膜)、硬膜下、直肠、胃肠道等,并且直接施用至特定或受影响的器官或组织。用于局部给药的制剂可包括洗剂类、酞剂类、乳膏剂类、乳剂类、软膏剂类、喷雾剂类、凝胶剂类等,并且可进一步配制成其他合适的制剂,例如防晒剂类、保湿洗剂类和乳膏剂类、面部凝胶剂类和乳膏剂类等。在这些组合中,将活性成分与一种或多种惰性辅料混合,所述惰性辅料包括,例如,水、丙酮、乙醇、乙二醇、丙二醇、丁烷1,3二醇、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、矿物油、及其混合物。局部给药也可涉及使用透皮给药,例如透皮贴剂类或离子电渗疗法装置类。本发明使用的术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内和胸骨内注射或输注技术。将化合物与适于所需给药途径的药学上可接受的载体、佐剂和媒剂混合。口服给药是优选的给药途径,并且适合口服给药的制剂均是优选的制剂。局部给药是另一种优选的给药途径,并且适合于局部给药的制剂均是优选的制剂。本发明所述的化合物可以固体形式、液体形式、气雾剂形式进行给药,或可以片剂、丸剂、粉末混合物、胶囊、颗粒剂、注射剂、乳膏剂、溶液剂、栓剂、灌肠剂、结肠灌洗剂、乳剂、分散剂、食品预混合物的形式以及其他合适形式进行给药。化合物亦可以脂质体制剂的形式进行给药。其他给药方法均是本领域已知的。

[0073] 用于局部给药的组合物可以是乳剂类或无菌溶液类。作为溶剂或媒剂,可使用丙二醇,聚乙二醇,植物油,特别是橄榄油,或可注射的有机酯类,在某些实施方案为油酸乙酯。所述这些组合物还可包含佐剂类,特别是润湿剂、等渗剂、乳化剂、分散剂和稳定剂。在某些实施方案,可使用细菌过滤器,通过辐射或通过加热,以几种方式进行灭菌。其亦可以无菌固体组合物的形式制备得到,所述固体组合物可在使用时溶解在无菌水或任何其他可注射无菌介质中。

[0074] 可根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂来配制可注射制剂,在一些实施方案,配制无菌的可注射水性或油质悬浮液。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液,在一些实施方案,为在丙二醇中的溶液。可使用的可接受媒剂和溶剂是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此,可使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯类或甘油二酯类。此外,发现脂肪酸(例如油酸)可用于注射剂的制备。

[0075] 用于口服给药的固体剂型可包括胶囊剂类,片剂类,丸剂类,散剂类和颗粒剂类。在此类固体剂型中,可将活性化合物与至少一种惰性稀释剂(例如,蔗糖、乳糖或淀粉)混合。此类剂型还可包含除惰性稀释剂以外的其他物质,例如润滑剂类(如硬脂酸镁)。就胶囊、片剂和丸剂而言,所述剂型还可包含缓冲剂类。片剂和丸剂还可用肠溶衣制得。

[0076] 口服给药的液体剂型可包括药学上可接受的乳剂类,溶液剂类,混悬剂类,糖浆剂类,以及酞剂类,其含有本领域通常使用的惰性稀释剂,例如水。此类组合物还可包含佐剂类,例如润湿剂类,乳化剂和助悬剂类,环糊精类,以及甜味剂、调味剂和芳香剂类。

[0077] 本发明化合物还可以脂质体的形式进行给药。如本领域已知的,脂质体通常衍生自磷脂类或其他脂质物质。脂质体由分散在水性介质中的单层或多层水合液晶形成。可使用能够形成脂质体的任何无毒、生理学上可接受的以及可代谢的脂质。除了本发明化合物以外,脂质体形式的本发明组合物还可包含稳定剂类、防腐剂类、赋形剂类等。优选的脂质

是天然以及合成的磷脂类和磷脂酰胆碱类(卵磷脂类)。形成脂质体的方法均是本领域已知的。参见,例如Prescott,Ed.,Methods in Cell Biology,Volume XIV,Academic Press,New York,N.W.,p.33et seq.(1976)。

[0078] 本发明制剂可包含两种或更多种本发明所述的化合物或组合物。

[0079] 本发明还提供了用于任一本发明所述方法的包含任何一种或多种本发明化合物的制品和试剂盒。

[0080] 可与载体物料组合以形成单一剂型的活性成分的量将根据所施用活性成分的宿主和特定的施用方式而变化。然而,应当理解,任何特定个体的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所用具体化合物的活性,患者的年龄、体重、体表面积、体重指数(BMI)、总体健康状况、性别和饮食;给药时间,给药途径,排泄率,或联合用药;以及特定疾病或病症的类型、进展和严重程度。可制造和施用所选择的药物单位剂量,以在身体的目标区域中提供确定的最终药物浓度。对于给定情况下的治疗有效量可通过常规实验容易地确定,并且在普通临床医生的技能和判断之内。

[0081] 可使用的单次或多次剂量包括独立选自以下的量:约0.1mg/kg至约600mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约500mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约400mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约300mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约200mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约100mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约50mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约30mg/kg体重,或约1.0mg/kg至约10mg/kg体重,或约10mg/kg至约600mg/kg体重,或约10mg/kg至约500mg/kg体重,或约10mg/kg至约400mg/kg体重,或约10mg/kg至约300mg/kg体重,或约10mg/kg至约200mg/kg体重,或约10mg/kg至约100mg/kg体重,或约50mg/kg至约150mg/kg体重,或约100mg/kg至约200mg/kg体重,或约150mg/kg至约250mg/kg体重,或约200mg/kg至约300mg/kg体重,或约250mg/kg至约350mg/kg体重,或约200mg/kg至约400mg/kg体重,或约300mg/kg至约400mg/kg体重,或约250mg/kg至约300mg/kg体重,或约300mg/kg体重。本发明化合物可以单次日剂量进行施用,或总日剂量可分每天2次、每天3次、每天4次的分剂量进行施用。

[0082] 可施用单剂量或多剂量。在一些实施方案,所述剂量可施用1次、2次、3次、4次、5次或6次。在一些实施方案,所述剂量以每天1次、每天2次、每天3次、或每天4次进行施用。在一些实施方案,所述剂量以每小时、每2小时、每3小时、每4小时、每6小时、每12小时、或每24小时进行施用。

[0083] 尽管本发明化合物可作为唯一的活性药物进行施用,但它们亦可与一种或多种用于治疗或抑制本发明所述疾病的其他药物联合使用。在一些实施方案,本发明化合物作为以治疗有效量存在的唯一活性药物来进行施用。

[0084] 当附加活性剂与本发明化合物联合使用时,附加活性剂通常可以如Physicians' Desk Reference (PDR) 53rd Edition (1999)中指出的治疗量使用,或以本领域普通技术人员已知的治疗有用量使用。

[0085] 本发明化合物和其他治疗活性剂或预防有效剂可以推荐的最大临床剂量或可以更低的剂量施用。可改变本发明组合物中活性化合物的剂量水平,以根据给药途径、疾病的严重程度以及个体反应来得到所需的反应。当与其他治疗剂或预防剂联合施用时,可将所述治疗剂或预防剂配制成同时或不同时间施用的单独组合物,或者可将所述治疗剂或预防剂作为单一组合物进行施用。

### 本发明化合物的制备

[0086] 鉴于本发明提供的公开内容,可使用对于本领域技术人员而言显而易见的通用方法和程序,由易得的起始物料制备得到本发明化合物。应当理解,在给出典型或优选工艺条件(即反应温度、时间、反应物摩尔比、溶剂、压力等)的情况下,除非另有说明,否则也可使用其他工艺条件。最佳反应条件可随所使用的特定反应物或溶剂而变化,但此类条件可由本领域技术人员通过常规优化方法来确定。C9的溶液对光敏感;理想情况下,应对室内照明进行过滤以滤除<450nm的波长(琥珀色滤光片)。如果未使用琥珀色照明,则应使用适当的控件以最大程度地减少曝光的溶液,例如,使用铝箔纸包装,琥珀色玻璃器皿。

[0087] 对于本发明所述的所有化合物和方法,当需要时,醌形式也可以其还原(氢醌)形式使用。同样,当需要时,氢醌形式也可以其氧化(醌)形式使用。采用本领域已知的方法,容易地将还原(氢醌)形式转化为氧化(醌)形式。参见,例如,空气,二氧化硅,Miller等人于2006年12月7日的PCT国际申请2006130775。氧化(醌)形式可使用本领域已知的方法容易地转化为还原的氢醌形式。参见,例如Zn,AcOH,Fuchs et al EJO C 6 (2009) 833-40。

[0088] 通过以下非限制性实施例和实施方案进一步描述本发明。

[0089] 重结晶.如实施例1A和3A所示,用于制备C9的合成方法导致产物具有一种或多种不希望的特性,例如高银含量、产物的粘性以及不希望的粒度和分布。一般而言,对于药物用途,优选具有窄粒度分布的产物固体。实施例3A所示产品的粘性使产品难以处理,包括使其研磨困难并且不能进行筛分。

[0090] 重结晶可产生改善的性能,例如,从产物固体中除去杂质,并生成尺寸和分布更均匀的材料,以在后续配制过程中改善产品性能。如实施例所示,发现了重结晶方法,其使得产物固体的质量得到改善,包括例如:提高的纯度、更高的熔点、更低的银含量、更好的流动性、更低的粘性以及更均匀的粒度和分布。此外,重结晶方法无需晶种,也不存在所述C9出油的问题。

[0091] 重结晶程序通常包含:将C9溶于溶剂,将混合物加热至约40-45°C以溶解所述C9,将混合物冷却至约32°C即发生结晶,和过滤所述产物。

[0092] 在一些实施方案,重结晶溶剂是约75-85% IPA/水。在一些实施方案,重结晶溶剂是约80-85% IPA/水。在一些实施方案,重结晶溶剂是约80-87% IPA/水。在一些实施方案,重结晶溶剂是约83-87% IPA/水。在一些实施方案,重结晶溶剂是约85% IPA/水。在一些实施方案,比例测定为(v:v)。在一些实施方案,比例测定为(重量:重量)。在一些实施方案,重结晶溶剂是甲醇和水的组合。在一些实施方案,重结晶溶剂是甲醇和庚烷的组合。

[0093] 当重结晶溶剂是IPA/水时,在一些实施方案,所述方法包含将所述C9溶解于IPA(例如,通过将混合物加热至约40-45°C),然后加入水。加入水后,所得混合物的温度可恢复至约40-45°C。在其他实施方案,所述方法包含将所述C9溶于IPA/水的混合物。

[0094] 在一些实施方案,将含有溶解C9的混合物进行抛光过滤。所述抛光过滤可在约40-45°C下进行或在将所述C9的溶液保持在所需的温度下进行。

[0095] 在一些实施方案,在数小时内,例如在约2-10小时内、或约4-8小时内、或约6小时内,将所述混合物冷却至约32°C。在一些实施方案,然后将混合物在约32°C下保持数小时,以使所述C9结晶,例如保持约2-24小时、或约4-8小时、或约6小时。

[0096] 在一些实施方案,然后将混合物进一步冷却。在一些实施方案,可将所述温度冷却

至约-5℃至约5℃,或约0℃。所述冷却可以一个单独的步骤进行,也可以多个步骤进行(例如,冷却至约24℃,然后冷却至约16℃,然后冷却至约0℃)。在一些实施方案,将所述混合物在约3-24小时的时间段内进行冷却。在一些实施方案,将所述混合物在约0℃下保持例如至少1小时或约1小时。

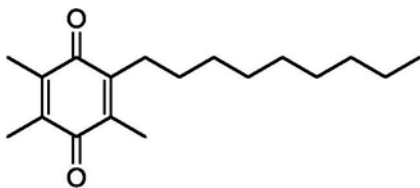
[0097] 重结晶程序使得C9产物的纯度提高。在各种实施方案中,通过HPLC测定,所述产物包含至少约95% a/a,或至少约96% a/a,或至少约97% a/a,或至少约98% a/a,或至少约99% a/a,或至少约99.5% a/a的所述C9,不含任何溶剂、载体或辅料。

[0098] 所述程序还可产生所要求保护的多晶型物的高纯度。在各种实施方案中,至少约95摩尔%,或至少约96摩尔%,或至少约97摩尔%,或至少约98摩尔%,或至少约99摩尔%,或至少约99.5摩尔%的所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮是多晶型物,不含任何溶剂、载体或辅料。

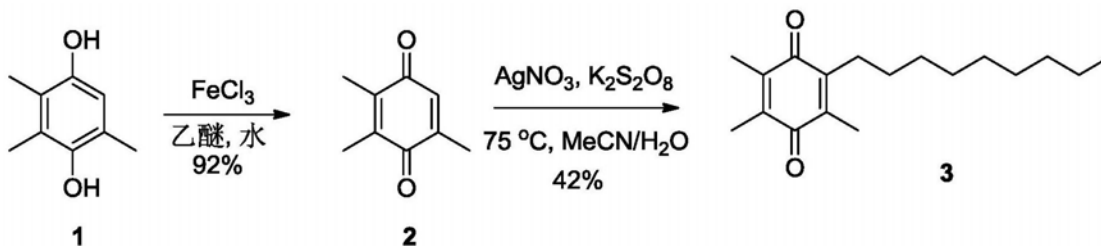
[0099] 所述程序还可导致C9的高效价(或含量)。效价(或含量)(potency) = (100% - HPLC测定的总杂质) x (100% - 水含量% - 总残留溶剂% - 灼烧残渣%)。效价(或含量)可计算如下: (HPLC测定的面积纯度%/100) \* (100 - %wt/wt水含量(KF) - %wt/wt残留溶剂 - %wt/wt灼烧残渣(ROI))。在各种实施方案中,所述2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的效价(或含量)是至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%,至少约99%,或至少约99.5%。

[0100] 所述程序还可导致粒度的分布更窄。D10代表对应于10%累计(从0至100%)的筛下粒度分布(即,小于D10的粒子百分比是10%)的粒子直径。D90代表对应于90%累计(从0至100%)的筛下粒度分布(即,小于D90的粒子百分比是90%)的粒子直径。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约11:1。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约10:1。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约9:1。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约8:1。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约7:1。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约6:1。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约5:1。在一些实施方案,所述粒子的D90:D10之比小于约4:1。

## 实施例



实施例1A. 2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(3)的合成



[0101] 在23℃下,向配有温度计和搅拌器的50L反应器中加入2,3,5-三甲基苯-1,4-二醇

(1) (1.39kg, 9.1mol) 和醚 (15L)。混合物搅拌30分钟后,变成澄清溶液。在3小时内滴加氯化铁 (5.6kg, 34.5mol) 的水 (20L) 溶液。将反应混合物在此温度下再搅拌2小时。分离有机相。排干的水层用乙醚 (3x5 L) 萃取。合并的有机相经硫酸钠干燥,浓缩。将残余物用二氯甲烷 (DCM) (1L) 稀释,然后用硅胶色谱法纯化(一根柱),得到所需产物2 (1.27kg, 95%)。TLC (石油醚 (PE) / 乙酸乙酯 (EA) = 30/1)。 $R_f$  (化合物1) = 0.2。 $R_f$  (产物2) = 0.6。

[0102] 向配有温度计和搅拌器的50L反应器中加入2,3,5-三甲基-[1,4]苯醌 (2) (780g, 5.2mol, 1.0当量)、癸酸 (895g, 5.2mol, 1.0当量) 和乙腈 (15L)。混合物在室温下搅拌30分钟后,变成澄清溶液。一次加入硝酸银 (882g, 5.2mol, 1.0当量)。将反应混合物加热至75°C。在2小时内滴加过硫酸钾 (1.54kg, 5.7mol, 1.1当量) 的水 (30L) 溶液。加毕后,将反应在75°C下再搅拌3小时。反应溶液冷却至室温。将水层排入15L水中,将其用乙酸乙酯 (3x 5L) 萃取。合并的有机相经硫酸钠干燥,过滤。浓缩滤液,得到黄色残余物,所得残余物用热甲醇 (800mL) 结晶。将固体过滤,用少量甲醇和乙醚洗,真空干燥,得到2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮 (3) (447g) 为黄色晶体附聚物。浓缩滤液,残余物经快速柱色谱法(石油醚:乙酸乙酯,100:1)纯化,得到另外的155g 2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮 (3) (总量:602g, 42%)。TLC (石油醚/乙酸乙酯 (PE/EA) = 30/1)。 $R_f$  (化合物2) = 0.5。 $R_f$  (产物3) = 0.6。 $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.46 (s, 2H), 2.02-2.01 (m, 9H), 1.35-1.26 (m, 22H), 0.88-0.86 (m, 5H)。 $\text{Ag} = 45\text{ppm}$ 。熔点49.9。

[0103] 所述产物具有高的银含量,并且由于是两种分离的组合,一种来自MeOH研磨法,另一种来自柱色谱分离,因此所述产物是不均匀的混合物,包含细颗粒和大块化合物。

实施例1B.2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮 (C9) 的重结晶

[0104] 概述. 在NaCl预处理后,通过由2-丙醇 (IPA) / 水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 进行重结晶,然后消化,收集,并通过空气和真空干燥来制备所述产物。起始原料 (实施例1A中制得的C9, 99.9g) 具有较高Ag含量 (45ppm),因此在干燥和重结晶之前,先对C9化合物的甲基叔丁基醚 (MTBE) 溶液进行盐水洗和两次水洗。将C9的MTBE溶液通过2.7 $\mu\text{m}$ 过滤器过滤,以除去氯化钠 (NaCl) 清洗后存在的任何微粒。在从MTBE到重结晶溶剂IPA的溶剂交换过程中,溶液中形成棕色固体,需进行热过滤才能去除。棕褐色固体可能是由于醌溶液的曝光所致,因此未作进一步分析。然后将过滤后的亮黄色溶液避光,浓缩,将残余物于40°C下溶于85% IPA/ $\text{H}_2\text{O}$  (486g/98g)。移除热量,在35°C下形成晶体。浆液在16°C下搅拌48小时,冷却至0°C,收集固体,清洗,于空气和真空 (~125mmHg) 下干燥至恒重,得到82.1g (82.1%) 的细黄针状物。所述材料通过NMR、UPLC、LCMS、IR和MP进行分析。

[0105] 通过NaCl清洗除去Ag. 将作为粉末和晶体混合物的黄色聚结体的粗制C9 (99.9g, 根据实施例1A制得) 溶于500mL甲基叔丁基醚 (MTBE),将带有小 (1-2mm) 黑色斑点的浑浊黄色液体用盐水 (100mL, 20wt% NaCl的 $\text{H}_2\text{O}$ 溶液) 洗。保留浑浊的黄色有机上层,弃去碎布层和澄清的无色水相。有机相用水 (2x 100mL) 洗,经无水硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 35g) 干燥。通过堆叠在55mm Whatman GF/D过滤器 (2.7 $\mu\text{m}$ ) 顶部的55mm Whatman 3型过滤器 (6 $\mu\text{m}$ ) 过滤澄清的黄色溶液,并用MTBE (2x 20mL) 冲洗容器。加入IPA (100mL),混合物通过旋转蒸发仪 (125-90mmHg, 40-25°C浴) 浓缩,得到亮黄色浆液 (180g)。加入IPA (348g),将浆液加热至澄清 (35°C, 120mmHg) 保持20分钟,然后将压力降至60mmHg,体积减小,直至晶体开始形成为止 (~45min)。所得浆液中无MTBE的气味。将浆液在35°C下浓缩至重量为182g,加入IPA (404g),加

热至40℃直至溶解,然后浓缩得到黄色固体(35mmHg)。加入IPA(500mL),将混合物搅拌过夜。

[0106] 过滤以除去棕褐色固体。在IPA溶液中发现棕色斑点,其通过堆叠的55mm Whatman 3型(8μm)和Whatman GF/D(2.7μm)过滤器进行热过滤(~40℃)除去。粘稠的棕褐色残余物留在过滤器上,然后将澄明的亮黄色溶液通过旋转蒸发仪浓缩得到黄色固体。

[0107] 重结晶。向所得黄色固体中加入IPA(486g),将容器加热至40℃,然后将水(98g)加至澄清的黄色溶液中。在2小时内将热量降低至21℃,得到含针状物的亮黄色浆液。将浆液在16℃下搅拌48小时,冷却至0℃,过滤粘稠黄色浆液(Whatman#54,150mm Buchner)。将细黄色针状物用冰冷却的85%IPA/H<sub>2</sub>O(2x 250mL,0℃)和IPA(100mL,0℃)冲洗。将固体抽吸1h,在布氏(Buchner)漏斗上安装腈坝,并在室内真空(~100mmHg)下放置过夜。黄色晶体(88.9g)仍然具有IPA气味,因此将其移至新的布氏漏斗/过滤器(漏斗已被C9残余物堵塞),于真空(100mmHg,6h)下保持恒定重量(82.1g,82.1%)。在室温下,将所得晶体转移至500mL琥珀色I型Schott-Duran(Amber Type I Schott-Duran)瓶中进行储存。约280mL晶体体积(82.1g)。

[0108] 采用合格方法进行CoA分析:水含量(KF)=0.05%;溶剂含量=0.23%;HPLC纯度=100%AUC;DSC测定的熔点=53.0℃;Ag含量<2.00ppm;灼烧残渣=0.02%;效价(或含量)(计算值)=99.71%,是与A型一致的晶型。

[0109] 效价(或含量)计算如下:(HPLC测定的面积纯度%/100)\*(100-%wt/wt水含量(KF)-%wt/wt残留溶剂-%wt/wt=灼烧残渣(ROI))。

#### 实施例2.重结晶筛选

[0110] 如实施例1A和3A所示,用于制备C9的合成方法导致产物具有一种或多种不希望的特性,例如高银含量、产物的粘性、以及不希望的粒度和分布。如上所述,重结晶可改善所述产物的性能。因此,筛选了多种溶剂以使其适合用于重结晶C9。

[0111] 将100mg的C9置于试管中,加入溶剂,并记录任何变化。然后将样品用热风枪短暂加热(加热至约45-50℃),记录溶解度情况,使其冷却至RT并记录溶解度情况,然后冷却至0℃并记录溶解度情况。结果如下表所示。

表1.重结晶的溶剂筛选

溶剂	大致浓度 (mg/mL)	RT 结果	加热结果	加热至 RT 结果	RT 至冷温结果
MeOH	100	微溶	可溶	微溶	不溶 – 长针状体
EtOH	100	部分可溶	可溶	微溶	部分可溶- 小针状体
IPA	100	可溶	可溶	可溶	部分可溶- 小针状体
70% IPA/H <sub>2</sub> O	100	微溶	大部分可溶-熔融	微溶 (溶解前变得浑浊且固体熔化)	微溶- 半透明针状体
MeCN	100	可溶	可溶	可溶	大部分可溶-小针状体
THF	100	可溶	可溶	可溶	可溶
95% EtOH	100	部分可溶	可溶	部分可溶	大部分不溶
水	10	不溶	不溶	不溶	不溶
80% EtOH	100	部分可溶	完全溶解前熔化	部分可溶	微溶
80% EtOH	50	部分可溶	溶解前熔化	部分可溶	微溶

[0112] 弃用以下溶剂:MeCN、THF,因为C9在冷温度(低温)下太易溶解,因此不适合使用。

[0113] 弃用以下溶剂:水,因为C9在较高温度下溶解不足,因此不适合使用。

[0114] 弃用以下溶剂:80%EtOH,因为C9材料在溶解前便熔化了,因此不适合使用。这是不利的,因为其将形成悬浮在溶液中的油。冷却后,其可能会结晶,但晶体通常不会均匀或不会使纯度增加。

[0115] 弃用95%EtOH,因为其含有MeOH和丙酮,这对制药业可能是有问题的,因此不适合使用。

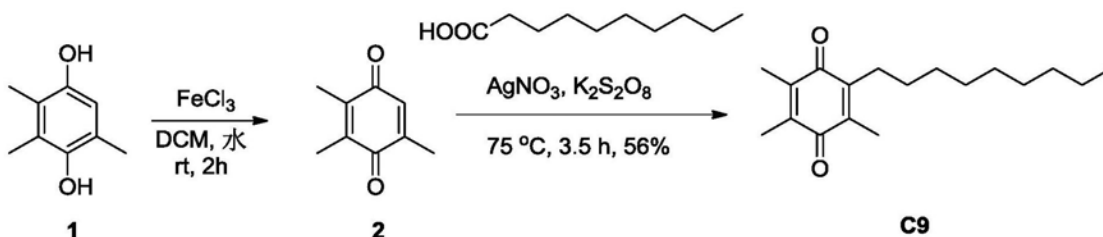
[0116] 甲醇和乙醇由于沸点低而不太优选使用。此外,不宜使用析出长针状体的MeOH,因为长针状晶体比更致密的粒子更难转移和过滤。

[0117] 注意到乙醇在加热时产生几乎完全可溶的物质,而在冷时产生部分可溶的物质。IPA也表现出类似的行为,但在100mg/mL的高温下可溶,在RT/冷时部分可溶。最初检测了乙醇/水混合物的溶解度,但由于C9化合物在>40°C时出油而被放弃。由于IPA的溶解度略好,在完全溶解前不会在较高温度下出油,而且IPA可与良好的抗溶剂(H<sub>2</sub>O)混溶,因此在证明乙醇不合适后对其进行了检测。70%IPA/H<sub>2</sub>O导致熔融问题和出油,而100%IPA在冷温下并非理想地不溶。因此,测试了70-100%之间的IPA浓度。

[0118] 对1g规模的测试溶液进行测定,表明75-85%IPA/水具有良好的溶解度(~10:1体积:重量),可过滤的细晶体,以及可加热和冷却以产生可预期的熔体/结晶的溶液。似乎没有必要使用晶种。当溶液在室温下暴露>1h时,需要将在结晶过程中形成的棕色物质进行热

过滤。这仅在溶液暴露于光下才观察到。回收率为92.7%的细针状体,上清液的UHPLC分析为91%a/a,而固体含量为99%,表明上清液已除去杂质。所得细的黄色针状物,其易于过滤和清洗,回收率高。UHPLC显示UHPLC面积%有所改善,晶体尺寸均相似,干燥后易于流动。

#### 实施例3A.2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的合成



[0119] 将化合物1 (2.0kg, 13.15mol, 1.0当量) 的二氯甲烷 (20L) 搅拌溶液于23°C下搅拌30分钟。在22小时内滴加氯化铁 (5.33kg, 32.88mol, 2.5当量) 的水 (19.04L) 溶液。反应混合物在此温度下再搅拌2小时。HPLC显示化合物1完全耗尽。分离有机相。排干的水层用二氯甲烷 (2x10L) 萃取。合并的有机相用水 (2x20L) 和盐水 (2x10L) 洗,经硫酸钠 (约5kg) 干燥,浓缩,得到粗制化合物2 (1.95kg, 粗品),其无需进一步纯化即可直接用于下一步骤。

[0120] 将化合物2 (1.25kg, 8.33mol, 1.0当量) 和癸酸 (1.44kg, 8.33mol, 1.0当量) 的乙腈 (25L) 混合物在室温下搅拌30分钟。一次加入硝酸银 (353.9g, 2.08mol, 0.25当量)。将反应混合物加热至75°C。滴加过硫酸钾 (2.48kg, 9.17mol, 1.1当量) 的水 (100L) 溶液。加毕后,将反应在75°C下再搅拌3.5小时。HPLC显示化合物2完全耗尽。将所得溶液冷却至室温。将水层排入50L水中,其用乙酸乙酯 (3x10L) 萃取。合并的有机相用氯化钠水溶液 (5L) 洗,经硫酸钠 (约5kg) 干燥,过滤。滤液浓缩。残余物经硅胶柱色谱法 (PE, PE/EA, 50/1) 纯化,得到粗产物。在快速柱色谱法 (FCC) (静置后固化) 后,得到油状产物。在固化之前,将其快速装入三颈烧瓶中。搅拌所述油状物,在搅拌下形成固体。将所述固体与甲醇 (2倍体积,以柱纯化后的粗产物量进行滴加) 在室温 (20~30°C) 下一起研磨过夜 (~15小时),然后过滤。所得滤饼用甲醇 (500mL) 洗,真空干燥:将固体装入带有真空泵 (0.5mmHg) 的20L旋转蒸发器于水浴 (<30°C) 中,持续7天,以8小时/天计,以除去残留溶剂:乙腈、甲醇、二氯甲烷和乙酸乙酯,从而得到C9 (1.28kg, 56%) 为黄色晶体。将产物铺展在不锈钢容器中,并用研钵粉碎以得到相似的尺寸。研磨过程重复几次。尝试过筛固体。但是,由于产品粘在筛网 (100目) 上,因此无法筛分固体。由于此种材料的研磨很困难,因此所得到的粒子很大并且难以配制。

[0121] TLC (PE/EA=30/1)。R<sub>f</sub> (化合物2) =0.5。R<sub>f</sub> (C9) =0.8。LC-MS:n/a。

[0122] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ2.45-2.42 (t, J=7.4Hz, 2H), 1.99-1.94 (m, 9H), 1.24 (m, 16H)。

[0123] 测定结果=HPLC 92.2%w/w,相对于参比标准品。

#### 实施例3B.2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的重结晶

[0124] 概述.本实施例总结了针对10g工程批次的C9重结晶和随后2.4kg C9的重结晶 (两个样品均由实施例3A提供)。将所述物料于40°C下溶于2-丙醇,然后加入水以得到浑浊的溶液,然后将所得溶液于40°C下通过夹套过滤器进行抛光过滤。将所得澄清溶液缓慢冷却至32°C,在此温度下产物自发地结晶为细黄色针状物。进一步逐步冷却至16°C,然后冷却至0°C,得到浆液,将其过滤进行收集,然后用85%2-丙醇的水溶液冲洗。将所得固体在真空下于25°C干燥至恒重,得到产物 (1.975kg),回收率为82%。测试分离出的固体,并通过DSC、IR

和<sup>1</sup>H NMR进行表征。

[0125] 讨论

[0126] 本实施例描述的工艺优点是：可控制形成真正的结晶固体，而无出油情况；无需晶种；测定/纯度增加；无粘性，流动性好；较窄的粒度分布；以及易于分离和干燥的规则形状的粒子。如有必要，对此种物料的研磨应该是很简单的。

[0127] 所提供的C9(根据实施例3A制得，纯度92.2%)的LCMS分析显示出主要杂质，所述杂质主要表现为总离子计数(TIC)，其在UV254下或蒸发光散射检测器(ELSD)中不可见。在母液中杂质的回收率高的情况下，所述杂质将被有效地从重结晶产物中清除。

[0128] 所实施的冷却方案产生的晶体没有出油现象或无需使用晶种，结晶在32℃时发生。

[0129] 最终产物分离提供了湿饼，将其转移至25℃的干燥烘箱中而不使用腈坝。

[0130] 重结晶(2.4kg)

[0131] 向配备有顶置式机械搅拌器、氩气入口和涂有特氟龙涂层的温度探针的50升夹套式反应器中加入C9(2400g)和2-丙醇(15.6L, Fisher A416)。将混合物于氩气下以75rpm进行搅拌，并将反应器用铝箔包覆。将反应器夹套加热至41℃(内部温度为40℃)，搅拌60分钟，以形成澄清溶液。

[0132] 向反应中加入去离子水(2.5L, Ricca 9150-5)，将溶液搅拌90分钟。使用正氩气压力(8psi)于40℃下通过P4(10-16um)烧结玻璃夹套式漏斗对溶液进行抛光过滤，并收集至20L玻璃大瓶中。

[0133] 用2-丙醇(2L, Fisher A416)冲洗50L反应器，并排至有机废物中。

[0134] 将澄清的上清液(36℃)重置到配有顶置式机械搅拌器、氩气入口和涂有特氟龙涂层的温度探针的50升夹套式反应器中，并加热至40℃。将溶液以75rpm进行搅拌，并在6小时内冷却至32℃，然后在32℃下再保持6小时。晶体已形成。将浆液冷却至24℃保持1小时，然后进一步冷却至16℃保持1小时，然后冷却至0℃保持1小时。

[0135] 使用正氩气压力(8psi)，将固体收集在P4(10-16um)烧结玻璃漏斗上。滤饼用2-丙醇/水(85/15v/v, 2x6L)冲洗，并在氩气流下干燥2小时，得到3450g黄色固体。将固体转移至真空烘箱中，于25℃下真空干燥240小时。以约24小时的时间间隔检查重量，直至达到恒重，以提供最终产物C9(1975g, 82.2%收率)为自由流动的黄色结晶固体。固体的DSC分析表明其在48.66℃开始熔化，熔点为50.13℃。HPLC分析显示为99.4%a/a纯度。

[0136] 将母液减压浓缩，得到400g红色油状物。对所述油状物的分析表明还有一些产物，其主要杂质峰由TIC表征，其在254nm处似乎没有明显的吸光度。杂质的分子量似乎为373(M<sub>H</sub>+H=374amu(原子质量单位))。

[0137] 采用合格方法进行CoA分析：水含量(KF)=0.06%；溶剂含量=0.24%；HPLC纯度=100%AUC；DSC测定的熔点=53.0℃；Ag含量<2.00ppm；灼烧残渣=<0.01%；效价(或含量)(计算值)=99.69%，晶型与A型一致。

实施例4.2, 3, 5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的多晶型物

[0138] 概述

[0139] 下表给出了原样A型及其熔体的总结。

固体	结晶度	DSC 起始温度 (°C)	DVS 质量变化 (wt.%)	24 小时溶解度 (mg/mL)*				
				FaSSGF	FeSSIF	FaSSIF	0.5% MC + 2% 吐温 80 (水溶液)	水
A 型	高	48.70	0.01 (15-75% RH); 0.08 (2-95% RH)	BDL	0.20	BDL	0.31	BDL
熔化 A 型	无	-	0.044 (15-75% RH); 0.073 (2-95% RH)	BDL	0.20	0.04	0.28	BDL

\*BDL: 低于检出限。

[0140] 表征

[0141] 原样固体(根据实施例1A和1B制备的ID 1-1)是稍微发粘的黄色粉体。将所述容器储存在5°C的冰箱中。由于所述材料对光敏感,因此使用琥珀色或箔包裹的小瓶来保护容器和所有样品瓶免受光照。材料(ID 1-1)的XRPD分析显示所述材料为晶体,并在4、12和16°2 $\theta$ 处具有高强度峰,以及其他几个较低强度峰;将此晶型指定为A型(图5)。表2示出了具有d间隔和强度的峰值列表。

表2. 材料(ID 1-1)的XRPD峰值列表,报告了相对强度>5的峰

2 $\theta$ (角)	D 间隔 (Å)	相对强度 (计数)
4.10	21.52	100
11.77	7.51	8
12.12	7.30	40
16.14	5.49	31
22.41	3.96	7

\*表2中的衍射图是采用带有Cu K $\alpha$ 1源,波长为1.540598 Å,和温度为23-25°C的Rigaku MiniFlex600得到。

[0142] 将材料(ID 1-1)溶于MeOD,并通过<sup>1</sup>H NMR进行分析(图6)。NMR光谱与2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮的结构一致。其也符合是无水的,而非溶剂化物。

[0143] 材料(ID 1-1)的DSC显示,其在48.70°C时开始熔化(图7)。同时TGA/DSC显示出与DSC一致的熔化起始温度,并且相关的失重步骤为0.26% (图8)。表3示出了包括方法等详细信息在内的DSC数据总结。

表3. 材料(ID 1-1)\*的DSC热分析图的峰值列表

起始温度 (°C)	峰 (°C)	归一化焓 (J/g)
48.70	50.45	-144.12

\*DSC热分析图是采用梅特勒-托利多 (Mettler Toledo) DSC3+在有盖、有针孔的密闭Al锅中以10°C/min、60mL/min N<sub>2</sub>从25-250°C进行斜坡升温的方法得到。

[0144] 以100倍(图9A)和400倍(图9B)的放大倍率捕获原样材料(ID 1-1)的显微图像。所述材料显示为矩形、板状形态。

[0145] 采用两个原样材料(ID 1-1)的样品进行卡尔·费休(KF)滴定法测定水含量,第一个样品为24mg,第二个样品为43mg;然而,此两个样品均未提供滴定仪的测定结果。这表明所述材料的水分含量低于仪器的检出限(>1ppm)。此结果与无水物质(ppm)相一致。

[0146] 通过动态蒸气吸附(DVS)仪器对原样材料(ID 1-1)进行加湿循环。在15%至75%的相对湿度范围内,材料的质量发生了0.01%的变化,在2%至95%的整个相对湿度范围内,质量发生了0.08%的变化。等温线图如图10所示。加湿循环后,通过XRPD分析所述固体。所观察到的模式与原样固体(ID 1-1)的模式(A型)相同;XRPD数据如图11所示。这些结果表明所述材料不具有吸湿性。

[0147] 将原样固体的样品溶解至0.5mg/mL的浓度,并通过HPLC进样以进行纯度分析。未观察到杂质。色谱图如图12所示。

[0148] 热处理

[0149] 称量15mg的原样材料(ID-1-1)置于DSC锅中,并在独立式DSC仪器上进行热处理,方法是以10°C/min的速率加热至60°C,然后以2°C/min的速率冷却至10°C。从锅中回收所得材料,并铺板进行XRPD分析(ID-10-1)。所述材料在48.74°C开始熔化,并在22.58°C开始放热进行重结晶。回收的材料通过XRPD显示为A型。DSC处理的热分析图如图13所示。XRPD数据如图14所示。

[0150] 热台显微镜法

[0151] 采用Linkam热台系统以在熔融期间捕获原样固体(ID-1-1)的图像。将少量材料置于热台内部的显微镜载玻片上,并采用温度斜坡方法以1°C/min的速率从30°C升至55°C。在斜坡升温期间以200倍的放大倍率捕获了一系列图像。直至熔融为止均未观察到形态变化(数据未示出)。熔融后,将热台自然冷却至室温,并以200倍的放大倍率监控所述材料的重结晶,但未观察到固体。样品看似是玻璃态。用21号针对所述材料进行处理,试图使其晶体成核。然后将载玻片从热台上移出,并以200倍的放大倍率捕获图像。所得材料似乎没有变化(数据未示出)。这表明所述化合物在室温下可以熔融液体形式(无定形)存在。

[0152] 固体形式稳定性

[0153] 在一周内评估了所述材料的固体形式稳定性。将49.0mg ID-1-1置于包覆有箔纸的4mL小瓶中,并用KimWipe包覆。将此小瓶置于含有饱和氯化钠水溶液的20mL小瓶内。将所述小瓶放置在40°C的热板上7天,在系统中形成75%相对湿度的气氛。7天后,将所述固体取样进行HPLC分析(ID-4-1)。

[0154] 所得色谱图在稳定性样品中未显示出任何杂质。色谱图如图15所示。将受压材料的样品铺板并通过XRPD进行分析;所观察到的模式是A型。XRPD数据如图16所示。ID-4-1的显微图像分别在100倍和400倍的放大倍率下捕获。图像分别如图17A(100倍)和图17B(400倍)所示。

[0155] 将固体形式的样品于55°C下加热直至熔融,然后冷却至室温保持5分钟,XRPD衍射图显示其为无定形(图31)。从温度循环DSC实验可以看出,在20°C下,所述熔体最终固化成A

型(图32)。这表明无定形液体形式是亚稳态的,并转换为A型。

[0156] 在模拟流体和水中的溶解度

[0157] 在禁食状态模拟胃液 (FaSSGF)、进食状态模拟肠液 (FeSSIF) 和禁食状态模拟肠液 (FaSSIF)、水、和0.5%甲基纤维素+2%吐温80的水溶液中,评估A型和熔融固体的溶解度。用11-13mg的原样材料 (ID-1-1) 制备得到5个用箔纸包覆的4mL小瓶,包括10mm搅拌棒。将5个箔纸包覆的4mL小瓶(包含11-13mg的C9)在热板上于70°C融化10分钟,然后冷却至室温5分钟,其中包括10mm搅拌棒。

[0158] 分别使用2.5mL模拟流体(包括0.5%甲基纤维素+2%吐温80的水溶液)或水中的原料材料ID-1-1 (A型) 和经熔化的C9来制备浆液。对含有经熔化的活性药物成分 (API) 的样品进行短暂超声处理,因为它们似乎含有团块材料。分别在30分钟和24小时时评估pH值和溶解度。为了进行溶解度分析,将每个样品取1mL移液至注射器过滤器中,将第一个0.5mL过滤回到源样品瓶中,将剩余0.5mL过滤到带有小容量插入物的HPLC小瓶中。

[0159] 利用校准点计算出的响应因子用于确定模拟流体和水中的API的浓度。采用ACN中的原样材料 (ID-1-1) 制备校准样品。绘制每个校准点的浓度和峰面积,并计算响应因子,以进行溶解度评估。

[0160] 实验设计和所得数据示于表5中。将每种浆液的剩余部分过滤并铺板用于XRPD分析。所观察到的所有模式均为A型(数据未示出)。

表5. 实验设计以及在模拟流体和水中的所得溶解度数据

模式	流体	30 min 时 浓度 (mg/mL)*	24 h 时浓 度 (mg/mL)*	纯流体 的 pH 值	30 min 时 pH 值	24 hr 时 pH 值	XRPD
A	FaSSGF	BDL	BDL	1.63	1.51	1.60	A
	FeSSIF	0.29	0.20	4.95	4.90	4.82	A
	FaSSIF	0.01	BDL	6.55	6.48	6.44	A
	0.5% MC + 2% 吐温 80 (水溶液)	0.53	0.31#	3.38	3.52	3.62	A
	水	BDL	BDL	~7.00	6.65	6.82	A
A (熔化)	FaSSGF	BDL	BDL	1.63	1.48	1.62	A

	FeSSIF	0.25	0.20	4.95	4.87	4.83	A
	FaSSIF	0.02	0.04	6.55	6.54	6.44	A
	0.5% MC + 2% 吐温 80 (水溶液)	0.22	0.28#	3.38	3.61	3.65	A
	水	BDL	BDL#	~7.00	7.18	7.29	A

\*BDL: 低于检出限

#采用Phenomenex Luna Phenyl Hexyl HPLC色谱柱和改进的方法。

[0161] 由于在UPLC色谱柱上观察到高压,因此使用不同的色谱柱和改进的方法,采集分别经0.5%甲基纤维素+2%吐温80的水溶液,24小时的水溶液(ID-30-4、ID-30-9和ID-30-10)处理的24小时数据点。将ID-30-4和ID-30-9的HPLC样品(其均含有甲基纤维素/吐温80混合物)用ACN稀释10倍。对这些样品以及一组新的校准点进样进行分析,确定新的响应因子,并计算剩余样品的溶解度(响应因子:8084.7908;R<sup>2</sup>:0.9989)。

实施例5. 实施例3A和实施例3B的C9的晶体形态

[0162] 概述

[0163] 来自实施例3A和3B所述批料的材料均为肉眼可见的黄色结晶固体。

[0164] 针对每个批料,以3个不同的放大倍率(25倍、10倍、400倍)拍摄多个显微图像,以避免在捕获图像时产生偏差。第一个批料ID-38-1(实施例3B)通过显微镜观察显示大部分为较大的粒子,范围从大约100 $\mu$ m至超过600 $\mu$ m。总体而言,所述粒子为规则形状、矩形和略微平面的形状,并表现出良好的双折射。

[0165] 第二个批料ID-38-2(实施例3A)与第一个批料相比,总体上显示为明显更小的粒子。所观察到的粒子范围在约50-350 $\mu$ m之间,并且这些粒子趋向于更加颗粒状或不规则形状。与第一个批料中始终观察到单个粒子的情况不同,第二个批料中较小的粒子也有明显粘附到较大粒子上的附聚现象。

[0166] 结果

[0167] 针对ID-38-1(实施例3B)以3种不同的放大倍率(25倍、100倍和400倍)进行显微镜检查。通过显微镜检查表明,此特殊批次的C9的粒度范围很广。

[0168] 在图18中,在25倍放大倍率下,可看到粒度和形状的变化。主要观察到的是矩形板状物;但亦有一些锯齿状的二维形状。在100倍放大倍率下,如图19所示,长度范围为约100 $\mu$ m-600 $\mu$ m;观察到双折射。在400倍放大倍率下,所述粒子太大而无法适配在帧内,但仍然很好地观察到了平滑的矩形双折射形状(图20)。

[0169] 针对ID-38-2(实施例3A)以3种不同的放大倍率(25倍、100倍和400倍)进行显微镜检查。与ID-38-1(实例3B)相比,此特殊批次的C9总体上显示出较小的粒子、较低的双折射、以及较小的附聚粒子“粘附到”一些所观察到的较大粒子上。

[0170] 在图21中,在25倍放大倍率下观察到小的附聚粒子。在100倍放大倍率下,如图22

所示,颗粒状的粒子变得更加可视,范围为约50 $\mu\text{m}$ -350 $\mu\text{m}$ 。还观察到几个较小的附聚粒子。在400倍放大倍率下,如图23A和23B所示,与ID-38-1(实例3B)情况不同的是,在帧内观察到了所述粒子。观察到呈类球形的半透明粒子,并且对于许多粒子也观察到了双折射。在此放大倍率下捕获了多幅图像,以证明所观察到的粒度范围很大,并观察到附聚在一些较大固体上的较小粒子。

#### [0171] 批次比较

[0172] 下面给出了ID-38-1(实施例3B)和ID-38-2(实施例3A)的直接比较。在25倍放大倍率下,很快便观察到了两个批料之间的形态和尺寸差异,如图24所示。在图25中,在100倍放大倍率下,与ID-38-02相比,对于ID-38-1观察到了更多的单个粒子,而在ID-38-02中观察到小粒子附聚到较大粒子上。在400倍放大倍率下,如图26所示,对于ID-38-1(实例3B),所述粒子太大而无法适配在帧内,但清楚地观察到了平滑的板状形态,而对于ID-38-2(实例3A),再次观察到了小粒子附聚到较大固体上。

#### [0173] 显微镜检查

[0174] 光学显微镜检查是采用配备有2.5倍、10倍、20倍和40倍物镜和偏光镜的Zeiss AxioScope A1数字成像显微镜进行。通过内置的AxioCam 105数码相机来捕获图像,并使用Zeiss提供的ZEN 2(蓝色版)软件进行处理。

#### 实施例6. 实施例3A和实施例3B的C9的粒度分布

[0175] 概述. 采用Malvern 3000Mastersizer(粒度分析仪)测定来自实施例3A(粗品)和实施例3B(重结晶)的C9的粒度分布。

[0176] 实施例3A, 制备例1. 称量24.4mg的C9样品置于小瓶中。加入约20mL水。将20滴5%辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(IGEPAL)的水溶液滴加至小瓶中。将溶液加盖盖紧并轻轻混合。

[0177] 实施例3A, 制备例2. 称量25.2mg的C9样品置于小瓶中。加入约20mL水。将20滴5%IGEPAL的水溶液滴加至小瓶中。将溶液加盖盖紧并轻轻混合。

[0178] 实施例3B, 制备例1. 称量24.7mg的C9样品置于小瓶中。加入约20mL水。将20滴5%IGEPAL的水溶液滴加至小瓶中。将溶液加盖盖紧并轻轻混合。

[0179] 实施例3B, 制备例2. 称量25.2mg的C9样品置于小瓶中。加入约20mL水。将20滴5%IGEPAL的水溶液滴加至小瓶中。将溶液加盖盖紧并轻轻混合。

#### [0180] PSD样品的目视观察

[0181] 观察到实施例3A样品是非常不均匀的固体。在样品中观察到许多大粒子。其两个制备例均包含相似的不均匀性。

[0182] 在实施例3B样品中观察到非常大的晶体。目视观察表明在此两个样品制备例中存在非常小的晶体到较大的晶体。样品2制备例在视觉上比样品1制备例含有更多的更小/更细的粒子。

#### [0183] 粒度分布

[0184] 采用Malvern 3000Mastersizer(粒度分析仪),通过激光衍射测定粒度分布。设置如表6所示。其他样品采用相同的设置。结果示于表7中。

#### 表6. 实施例3A, 制备例1的Malvern仪器设置

<b>粒子类型</b>	
非球形粒子模式	是
是弗劳恩霍夫 (Fraunhofer) 类型	否
<b>材料特性</b>	
折射率	1.480
吸收指数	0.001
粒子密度	1.00 g/cm <sup>3</sup>
蓝光中的不同光学特性	是
折射率 (蓝光)	1.480
吸收指数 (蓝光)	0.001
<b>分散剂性能</b>	
分散剂名称	水
折射率	1.330
液位传感器阈值	100.000
<b>测定持续时间</b>	
背景测定持续时间 (红光)	15.00 s
样品测定持续时间 (红光)	15.00 s
执行蓝光测定?	是
背景测定持续时间 (蓝光)	15.00 s
样品测定持续时间 (蓝光)	15.00 s
评估光背景的稳定性	否

<b>测定序列</b>	
等分试样	1
自动测定次数	否
预对准延迟	0.00 s
测定次数	3
测定之间的延迟	0.00 s
预测定延迟	0.00 s
测定后关闭测定窗口	否
<b>测定遮蔽设置</b>	
自动启动测定	否
遮蔽下限	1.00 %
遮蔽上限	10.00 %
启用遮蔽过滤	否
<b>测定警报</b>	
使用背景检查	否
背景检查限制	[1,200],[20,60]

表7.C9样品的粒度分布

<b>实施例 3A</b>			
<b>合并结果 (2 个制备例, 对于每个制备例 N=3)</b>	<b>d(v ,0.1) (μm) (D10)</b>	<b>d(v ,0.5) (μm) (D50)</b>	<b>d(v ,0.9) (μm) (D90)</b>
<b>平均值</b>	59.78	278.83	926.00
<b>RSD (%)</b>	5.68	10.27	13.51
<b>实施例 3B</b>			
<b>合并结果 (2 个制备例, 对于每个制备例 N=3)</b>	<b>d(v ,0.1) (μm) (D10)</b>	<b>d(v ,0.5) (μm) (D50)</b>	<b>d(v ,0.9) (μm) (D90)</b>
<b>平均值</b>	133.22	433.33	877.67

RSD (%)	43.71	13.54	5.71
---------	-------	-------	------

[0185] 如表7所示,两个实施例均由相当大的粒子组成,但实施例3B的平均值却相当大:实施例3A的平均值 $d(v,0.5\mu\text{m}) = 278\mu\text{m}$ ,实施例3B的平均值 $d(v,0.5\mu\text{m}) = 433\mu\text{m}$ 。然而,实施例3A具有较宽的尺寸分布,这可能是由于3A的部分研磨(3A的 $d(v,0.1\text{至}0.9) = \sim 60\mu\text{m}$ 至 $925\mu\text{m}$ 相对于3B的 $d(v,0.1\text{至}0.9) = \sim 133\text{至}878\mu\text{m}$ )所致。图27和28(实施例3A制备例1和2)以及图29和30(实施例3B制备例1和2)分别示出了每种分析的代表性实例。从图27和图29可以看出,与实施例3B(重结晶)样品相比,实施例3A样品具有更宽的粒度分布和双峰特征。与实施例3A样品(D90和D10比例为15.5:1)相比,实施例3B样品中的D90和D10之间的分布范围更窄(比例为6.6:1)。D10代表对应于10%累计(从0到100%)的筛下粒度分布(即,小于D10的粒子百分比为10%)的粒子直径。D90代表对应于90%累计(从0到100%)的筛下粒度分布(即,小于D90的粒子百分比为90%)的粒子直径。每个制备例的代表性实施例示出在图27-30(分别为实施例3A制备例1,实施例3A制备例2,实施例3B制备例1,实施例3B制备例2)中。如图27-30所示,实施例3A样品比实施例3B(重结晶)样品具有更宽的粒度分布。

实施例7. 从帕金森病(PD)和阿尔茨海默氏病(AD)患者的人皮肤成纤维细胞中筛选化合物

[0186] 进行了初步筛选以鉴定化合物改善PD和AD的有效性。以与以下文献中所述方式类似的方式:Jauslin et al.,Hum.Mol.Genet.11(24):3055(2002);Jauslin et al.,FASEB J.17:1972-4(2003);和国际专利申请WO 2004/003565,测试了样品和溶剂对照拯救PD和AD成纤维细胞的能力,所述PD和AD成纤维细胞是通过添加L-丁硫氨酸-(S,R)-亚磺酰亚胺(BSO,GSH合成酶的特异性抑制剂)和铁(例如柠檬酸铁)而加重病情。通过施用本发明所述的化合物可预防或改善此种特异性BSO介导的细胞死亡。

[0187] AD实验如下进行。PD实验以类似的方式进行;某些特定条件在下文表1A中注明。

[0188] MEM(富含氨基酸和维生素的培养基)和带有Earle平衡盐(Earle's Balanced Salts,EBS)且不含酚红的培养基199(M199)均购自英杰公司(Invitrogen)。胎牛血清得自康宁公司(Corning)。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)均购自PeproTech。青霉素-链霉素-谷氨酰胺混合物、L-丁硫氨酸(S,R)-亚磺酰亚胺、柠檬酸铁和牛胰腺胰岛素均购自Sigma。钙黄绿素AM购自Anaspec。通过使450mL MEM、50mL胎牛血清、100U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素组合来制备细胞培养基。通过以下方式制备测定培养基:使125mL M199、50mL胎牛血清、100U/mL青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、2mM谷氨酰胺,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素、10ng/mL EGF和10ng/mL bFGF组合;加入MEM使体积达到500mL。在水中制备10mM BSO和10mM柠檬酸铁溶液,然后进行过滤器灭菌,并储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下。

[0189] 将测试样品装入1.5mL玻璃小瓶或聚丙烯小瓶中。用DMSO稀释化合物,得到1mM储备溶液。溶解后,将其储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下。

[0190] 根据以下方案筛选测试样品:

[0191] 从于液氮中储存约500,000个细胞的小瓶开始培养AD或PD患者来源的成纤维细胞。将细胞于细胞培养基中繁殖,每3天通过胰蛋白酶消化以1:3的比例进行继代培养。汇合后,通过胰蛋白酶消化来收集成纤维细胞,然后重悬于测定培养基中,并以每孔2500个细胞/0.1mL的最终细胞密度接种于标准96孔组织培养板中。将板于37 $^{\circ}\text{C}$ 下,在95%湿度和5%

CO<sub>2</sub>的气氛中孵育5小时,以使细胞附着于培养板,然后加入柠檬酸铁溶液(水溶液)至所需的最终浓度。

[0192] 将测试样品(1mM的DMSO溶液)在10%DMSO的水溶液中稀释至最终浓度为5μM,然后在10%DMSO中依次稀释至所需浓度。然后用各种化合物稀释液处理细胞,使最终DMSO浓度为1%,然后于37°C下,在95%湿度和5%CO<sub>2</sub>的气氛中孵育18小时。

[0193] 次日,将BSO溶液加至孔中,以达到所需的最终浓度。48小时后,弃去培养基,并轻轻地将板倒置在纸巾上,以除去残留的液体。所述板用每孔100微升含钙和镁(+Ca+Mg)的PBS清洗1次。

[0194] 然后将100微升钙黄绿素AM(1μM)的PBS+Ca+Mg溶液加至每个孔中。将板在37°C下孵育30分钟。此后,在Spectramax荧光读板机(酶标仪)上读取荧光(激发/发射波长分别为485nm和525nm)。数据采用标准的四参数曲线拟合算法(XLFit或Prism)进行分析,以确定每个化合物的EC<sub>50</sub>浓度。

[0195] 溶剂(DMSO,水)对未经BSO处理的细胞的活力既无有害影响,即使在最高测试浓度(1%)下,它们对经BSO和铁处理的成纤维细胞亦无有益影响。

[0196] 研究发现本发明所述的测试样品可从BSO和铁诱导的氧化应激中拯救帕金森病和阿尔茨海默氏病患者的成纤维细胞。

表8. 从BSO(125μM)和铁(125μM)诱导的氧化应激中拯救PD患者成纤维细胞

化合物 (#C)	PD (ND29542)		
	EC <sub>50</sub> (nM)	SEM	最大拯救 (@ 500 nM)
C6	>500	20	39
C8	>500	97	73
C9	84	4	103

EC<sub>50</sub> = 观察到细胞活力的50%最大拯救的浓度

SEM = 平均值的标准误差。

表9. C9从BSO和铁诱导的氧化应激中拯救AD患者成纤维细胞

细胞系	EC <sub>50</sub> (nM)			
	柠檬酸铁 (50 μM) + BSO (50 μM)	柠檬酸铁 (100 μM) + BSO (25 μM)	柠檬酸铁 (100 μM) + BSO (100 μM)	柠檬酸铁 (200 μM) + BSO (100 μM)
ND34730	15	24	-	-
ND41001	13	17	-	-
AG04402	-	-	5	12
AG11414	-	-	11	23

- = 未测试

[0197] 如表8所示,在从BSO和铁介导的氧化应激中拯救PD成纤维细胞方面,C9化合物(2,

3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮)具有比C6和C8类似物更大的效价强度。

[0198] C9化合物还表现出在从氧化应激中拯救AD患者成纤维细胞方面的活性(表9)。

#### 实施例8. 筛选抑制 $\alpha$ -突触核蛋白聚集的化合物

[0199] 概述:通过蛋白质聚集动力学中滞后相的存在和程度进行测定,测试了化合物2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(“C9”)及其C8(2,3,5-三甲基-6-辛基环己-2,5-二烯-1,4-二酮)和C7(2,3,5-三甲基-6-庚基环己-2,5-二烯-1,4-二酮)类似物作为 $\alpha$ 突触核蛋白聚集抑制剂的功能。跟踪由聚集体结合的荧光团(硫黄素T)引起的荧光强度变化,以报告蛋白质聚集随时间的变化。

[0200] 实验方法:在100 $\mu$ M化合物(来自10mM储备溶液的DMSO溶液)存在下或以1% (v/v) DMSO作为溶媒的情况下,采用200 $\mu$ M重组人 $\alpha$ 突触核蛋白(Proteos, Inc.)建立无细胞 $\alpha$ 突触核蛋白聚集测定试验。所有溶液均在含0.03% (v/v)  $\text{NaN}_3$ 和5 $\mu$ M硫黄素T(ThT)的杜尔贝科(Dulbecco's)磷酸盐缓冲盐水(DPBS)缓冲液(pH 7.4)中制备,并在添加蛋白质或化合物之前作为预混液制备。然后制备蛋白质预混液,并分成4个试管(1个试管对应1个条件)。与此同时,在相同条件下创建了用于背景测定的预混液,只是未向所述溶液添加蛋白质。每个样品载有化合物或DMSO,将其涡旋10秒,离心3秒。

[0201] 然后将蛋白质溶液+/-化合物及背景样品加载到具有黑壁的光学透明的96孔板(Corning Costar)的孔中,将其用LightCycler®480密封件(Roche Life Science)密封,于70 $^{\circ}$ C下孵育15分钟以达到平衡,然后开始数据收集。每隔30分钟,使用Tecan M1000光谱仪收集ThT荧光(激发/发射波长450/490nm)上的数据点。通过在两次荧光读数之间摇动来搅动所述板。

[0202] 数据分析与结果:随时间收集所有样品的荧光强度数据。经溶媒处理的 $\alpha$ 突触核蛋白样品的平均值的终点荧光强度单位(FIU)值设置为100%,所有其他FIU值均相对于其进行归一化(见图1A)。最终结果绘制为相对于时间的归一化ThT荧光(%)。

[0203] 采用 $t=24$ 小时时的归一化ThT荧光值(%FIU)对样品进行比较(参见图1B)。每个条件至少使用2个技术重复。通过普通的单因素方差分析进行样品的统计分析。针对所有含蛋白质的样品进行了Tukey多重比较测试,所述测试显示经溶媒处理的样品与经C9处理的样品( $p=0.0041$ ),经C9处理的样品与经C7处理的样品( $p=0.0085$ ),以及经C9处理的样品与经C8处理的样品( $p=0.0437$ )之间具有统计学意义。而所有其他比较均无统计学意义(即ns), $p>0.05$ 。

[0204] 如图1A和图1B所示,C9化合物对 $\alpha$ 突触核蛋白聚集具有显著的抑制作用,并且表现出比C7或C8类似物更强的抑制作用。

实施例9.2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(C9)及其结构类似物对Tau K18 WT预形成原纤维分解的效价强度

[0205] 概述:通过聚集体结合的荧光团(硫黄素T)的荧光强度随时间的降低进行测定,测试了化合物2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(C9),2,3,5-三甲基-6-辛基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(C8)和2,3,5-三甲基-6-庚基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(C7)分解人野生型Tau K18片段的预形成原纤维(PFF)的能力。

[0206] 实验方法:人重组Tau K18 WT片段的预形成原纤维(PFF)是通过在杜尔贝科(Dulbecco's)磷酸盐缓冲盐水(DPBS)缓冲液(pH 7.4)中,在过量(50倍)三(2-羧乙基)磷

(TCEP) 作为还原剂存在的情况下,将Tau K18单体(Bio-Techne®)与肝素钠以1:1的比率孵育而生成。将混合物在不搅拌的情况下于37°C孵育4天,产生最终浓度为100 $\mu$ M的PFF。

[0207] 在30 $\mu$ M化合物(来自10mM储备溶液的DMSO溶液)存在下或以0.3% (v/v) DMSO作为溶媒的情况下,采用10 $\mu$ M Tau PFF建立无细胞Tau分解测定试验。所有溶液均在含0.03% (v/v) NaN<sub>3</sub>和5 $\mu$ M硫黄素T(ThT)的DPBS缓冲液(pH 7.4)中制备,并在添加蛋白质或化合物之前作为预混液制备。在测定的前一天,首先准备了蛋白质预混液,以在环境温度和大气下以10 $\mu$ M的浓度预先平衡Tau PFF。次日,将预混合的蛋白质溶液分成4个试管(1个试管对应1个条件)。每个样品载有化合物或DMSO,将其涡旋10秒,离心3秒,然后在环境温度下孵育15分钟。与此同时,在相同条件下创建了用于背景测定的预混液,只是未向所述溶液添加蛋白质。

[0208] 然后将PFF溶液+/-化合物和背景样品加载到具有黑壁的光学透明的96孔板的孔中,将其用LightCycler®480密封件(Roche Life Science)密封,于37°C下孵育15分钟以达到平衡,然后开始数据收集。每隔30分钟,使用Tecan M1000光谱仪收集ThT荧光(激发/发射波长450/490nm)上的数据点,而无需搅动。

[0209] 数据分析与结果:经溶媒处理的Tau样品的最大荧光强度单位(FIU)值设置为100%,所有其他FIU值均相对进行归一化。每个条件至少使用2个技术重复。报告了测定试验开始94小时后所有样品的原纤维含量的终点值(图2)。

[0210] 通过普通的单因素方差(ANOVA)分析进行样品的统计分析。Dunnett多重比较测试是在经溶媒处理的Tau PFF样品与经化合物处理的Tau PFF样品之间进行,这表明经溶媒处理的样品与经C9处理的样品之间具有统计学意义( $p=0.0478$ )。

[0211] 如图2所示,经C9处理的样品在94小时时Tau原纤维含量显著降低。相反,经C7和C8处理的样品在94小时时原纤维含量均无明显降低。

#### 实施例10. 抑制RSL3诱导的 $\alpha$ 突触核蛋白聚集

[0212] 采用得自Origene(RG221446)的质粒构建体,将N27大鼠多巴胺能细胞(购自EMD Millipore, SCC048)进行转化,以稳定过表达与绿色荧光蛋白(GFP)融合的截短的 $\alpha$ -突触核蛋白。将细胞保持在选择培养基中,所述选择培养基由补充有10% (v/v) 胎牛血清(Millipore, ES-009-B), 1% (v/v) 青霉素-链霉素(Gibco, 15140-122), 1% (v/v) L-谷氨酰胺(Gibco, 25030-081)和500 $\mu$ g/mL的G418(Gibco, 10131-027)的RPMI 1640培养基组成。

[0213] 如上所述,将过表达截短的(112个氨基酸)人 $\alpha$ 突触核蛋白-GFP融合蛋白的N27大鼠多巴胺能细胞于上述正常培养条件下保持。在实验前一天,将细胞以3,000个细胞/孔的密度接种在96孔具有光学底部、黑色壁的板中,并于37°C下保持24小时。通过使用D300e超微量加样仪(Tecan),采用化合物(1S,3R)-甲基2-(2-氯乙酰基)-1-(4-(甲氧基羰基)苯基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-羧酸酯(1S,3R-RSL3,记载于Yang et al., Cell 156:317-331(2014)中)(60nM)以及70nM化合物(2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(C9)、2,3,5-三甲基-6-辛基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(C8)、或2,3,5-三甲基-6-庚基环己-2,5-二烯-1,4-二酮(C7))共同处理细胞,并放回37°C的孵化器中保持24小时,来启动实验。将细胞在室温下用4%多聚甲醛固定15分钟,用Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)缓冲液清洗3次,然后在室温下与1% Triton-X 100溶液(其DPBS溶液)一同孵育48小时,以能够选择性标记聚集的 $\alpha$ 突触核蛋白。然后清洗细胞,并使用标准免疫细胞化学(ICC)

方法标记总 $\alpha$ 突触核蛋白(小鼠抗 $\alpha$ 突触核蛋白,1:250,BD Biosciences)。将细胞与一抗于4℃下孵育过夜,然后在次日用DPBS清洗3次。然后将细胞与荧光偶联的二抗(山羊抗小鼠Alexa 647,Invitrogen)在室温下孵育2小时。亦将10nM Hoechst添加至标记核中,并在高内涵成像平台(ThermoFisher,HSC Cellomics Arrayscan)上对细胞成像,以量化总聚集的 $\alpha$ 突触核蛋白(参见图3A)。

[0214] 图3B示出了化合物C7、C8和C9对RSL3诱导的 $\alpha$ 突触核蛋白聚集的抑制。将仅经RSL3处理的细胞与经RSL3和化合物两者处理的细胞进行比较,采用Dunnett多重比较测试,通过普通的单因素方差分析(ANOVA)对样品进行统计分析。C7未表现出对 $\alpha$ 突触核蛋白聚集的任何抑制( $p>0.05$ )。C8和C9均表现出对 $\alpha$ 突触核蛋白聚集的显著抑制作用( $p$ 值分别为0.01和0.0003),但C9表现出比C8高约5.45倍的聚集抑制水平。

实施例11. 2,3,5-三甲基-6-壬基环己-2,5-二烯-1,4-二酮在帕金森病小鼠MPTP模型中的有效性

[0215] 概述

[0216] 用(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)(MPTP)(60mg/kg)处理动物,会导致纹状体中多巴胺的大量消耗(~74%),其与文献报告和内部验证研究一致。

[0217] 施用C9(300mg/kg)对垂直活动(垂直计数和垂直时间,如图4A和4B所示)产生了显著治疗效果。

[0218] 简介

[0219] MPTP是有效的选择性黑质纹状体多巴胺能神经毒素,可在人、非人灵长类动物和小鼠中产生帕金森病(PD)的许多神经病理学特征。在小鼠中,MPTP会产生黑质纹状体多巴胺能变性。可增加多巴胺能功能或阻断MPTP的神经毒性的药理学药物亦可减轻MPTP相关的运动功能障碍,并已在临床上用于治疗帕金森病。此外,MPTP介导的毒性可能与所述疾病中多巴胺能丧失相关的机制有关,这表明此模型也可能潜在地用于鉴别可减缓或减少黑质纹状体多巴胺能丧失的药物。

[0220] 在本项研究中,在MPTP诱导的PD模型中对C9进行了测试。本研究的终点是在旷场测定试验中的自主活动参数。

[0221] 实验程序

[0222] 动物.种类:小鼠.菌株:C57B1/6.动物来源:Charles River.年龄:6至7周.性别:雄性.随机化:将动物随机分配至治疗组.研究盲法:实验者对实验治疗方法不知情。

[0223] 饲养和进食.适应环境/调节:不少于三天.饲养:将小鼠以12小时光照/黑暗周期进行饲养(光照在上午6:00)。每个笼子不超过4只小鼠.通风的笼架系统.饮食:标准啮齿动物食物和饮水随意。

[0224] 设计参数.给药途径:PO.剂量体积:PO:5mL/kg.配方:由Melior根据BioElectron的用法说明书进行配制.溶媒-芝麻油(Spectrum Chemical,NF目录#SE130,CAS#8008-74-0)。剂量水平:300mg/kg.剂量频率:QD,从第-2天开始(MPTP=第0天),直至第7天为止.研究持续时间:11天.预处理时间(至多2小时):对于第0天(MPTP天):30分钟,旷场试验/自主活动(OFA/LMA)分析的预处理时间:1小时.组别数目:3.每组动物数量:10.动物总数量:30只(在本研究中),总共42只动物(为确保对至少10只动物/组进行恰当的功效分析,对于所有接受MPTP的组别,如果出现MPTP引起的致死,则再添加4只动物以减轻研究影响)。

[0225] MPTP治疗.MPTP是在磷酸盐缓冲盐水中进行配制,以20mg/kg的剂量(以1mg/mL的剂量递送至20mL/kg)以2小时的时间间隔分3次施用于小鼠(MPTP的最终剂量=60mg/kg)。

[0226] 自主活动.在施用MPTP的前一天(基线)和施用后的第7天(第(-1)天和第7天),使用全自动的旷场设备(Med-Associates, Inc)监测小鼠运动功能的各个方面。所述设备由封闭在隔音箱中的10.75英寸x 10.75英寸场所组成,配备有风扇和室内照明灯。所述场所配备有位于X轴和Y轴上3个16光束IR阵列用于位置跟踪,以及配备有Z轴用于饲养检测。

[0227] 根据给药方案,在旷场试验之前1小时,向所有小鼠施用终剂量的C9或溶媒-芝麻油。与多巴胺能缺乏症有关的关键运动参数包括饲养行为(饲养次数/每15分钟一次)和总行进距离(每15分钟)。

[0228] 数据分析.将数据取平均值,并表示为平均值±SEM。数据通过单因素方差分析(ANOVA)进行分析,然后进行事后检验。小于0.05的p值视为与对照组相比具有统计学意义。

[0229] 结果

[0230] 治疗对旷场运动试验(垂直计数)的影响.测定了用盐水+溶媒、MPTP+溶媒、或MPTP+C9处理的动物在旷场设备中的活动(垂直计数)。动物接受如上所述的治疗和处理。如图4A所示,与经盐水+溶媒处理的动物组相比,经MPTP+溶媒处理的动物组的垂直计数降低( $p=0.06$ )。经C9处理后,受MPTP刺激的动物组的垂直计数恢复到在盐水+溶媒对照动物组中所观察到的垂直计数(MPTP+溶媒相对于MPTP+C9,  $p<0.01$ ; 盐水+溶媒相对于MPTP+C9,  $p=0.312$ )。数据表示为平均值+SEM,每组 $n=12-14$ 。统计分析:单因素方差分析(ANOVA)和事后Tukey检验,用于多重比较测试; \*\* $p<0.01$ ; ns,表示无统计学意义( $p>0.05$ )。

[0231] 治疗对旷场运动试验(垂直时间)的影响.测定了用盐水+溶媒、MPTP+溶媒、或MPTP+C9处理的动物在旷场设备中的活动(垂直时间)。动物接受如上所述的治疗和处理。如图4B所示,与经盐水+溶媒处理的动物组相比,经MPTP+溶媒处理的动物组的垂直时间降低( $p<0.05$ )。经C9处理后,受MPTP刺激的动物组的垂直时间恢复到在盐水+溶媒对照动物组中所观察到的垂直时间(MPTP+溶媒相对于MPTP+C9,  $p<0.001$ ; 盐水+溶媒相对于MPTP+C9,  $p=0.315$ )。数据表示为平均值+SEM,每组 $n=12-14$ 。统计分析:单因素方差分析(ANOVA)和事后Tukey检验,用于多重比较测试; \*,  $p<0.05$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ ; ns,表示无统计学意义( $p>0.05$ )。

[0232] 通过垂直计数和垂直时间测定,在PD的MPTP小鼠模型中采用C9进行给药,显示自主活动显著改善,其中垂直计数和垂直时间是反映纹状体中多巴胺能功能的两个行为指标(Meredith and Rademacher, J Parkinsons Dis.1(1):19-33(2012),以及其中的参考文献)。

实施例12. 雄性C57小鼠急性口服给药后C9的PK特征

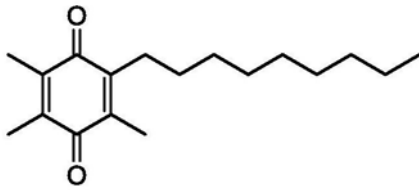
[0233] 以300mg/kg剂量的C9芝麻油溶液经口服灌胃施用于4只C57BL/6小鼠。化合物给药后8小时,测定血浆及脑暴露量(表10)。

[0234] 表10. 口服给药后小鼠脑及血浆中C9的暴露量

给药剂量 (mg/kg)	给药途径	时间 (h)	C9 [血浆] (ng/mL)	C9 [脑](ng/g)	脑: 血浆比值
300	PO	8	3830	27925	7

[0235] 本发明的非限制性实施方案包括以下内容：

[0236] 实施方案1. 治疗或抑制选自自由以下组成的组的疾病的方法：阿尔茨海默氏病、帕金森病、外伤性脑损伤、和缺血再灌注相关损伤，所述方法包含对有此需要的受试者施用治疗有效量的下式化合物：



或其氢醌形式；或其溶剂化物或水合物。

[0237] 实施方案2. 根据实施方案1所述的方法，其中所述化合物不为溶剂化物或水合物。

[0238] 实施方案3. 根据实施方案1或2所述的方法，其中所述化合物为所述醌形式。

[0239] 实施方案4. 根据实施方案1或2所述的方法，其中所述化合物为所述氢醌形式。

[0240] 实施方案5. 根据实施方案1-4任一所述的方法，其中所述方法用于治疗或抑制阿尔茨海默氏病。

[0241] 实施方案6. 根据实施方案1-4任一所述的方法，其中所述方法用于治疗或抑制帕金森病。

[0242] 实施方案7. 根据实施方案1-4任一所述的方法，其中所述方法用于治疗或抑制外伤性脑损伤。

[0243] 实施方案8. 根据实施方案1-4任一所述的方法，其中所述方法用于治疗或抑制缺血再灌注相关损伤。

[0244] 实施方案9. 根据实施方案1-4任一所述的方法，其中所述方法用于治疗或抑制中风。

[0245] 实施方案10. 根据实施方案1-9任一所述的方法，其中所述方法用于治疗所述疾病。

[0246] 实施方案11. 根据实施方案1-9任一所述的方法，其中所述方法用于抑制所述疾病。

[0247] 实施方案12. 根据实施方案1-11任一所述的方法，其中所述化合物是口服施用。

[0248] 实施方案13. 根据实施方案1-11任一所述的方法，其中所述化合物是静脉内施用。

[0249] 本发明通过标识引用提及的所有出版物、专利、专利申请和公开专利申请的公开内容均通过引用其全文并入本申请。

[0250] 尽管为了清楚理解的目的，已通过举例说明和实施例的方式对前述发明进行了详细描述，但对于本领域技术人员而言显而易见的是，可进行某些微小的变化和修改。因此，本说明书和实施例不应解释为限制本发明的范围。

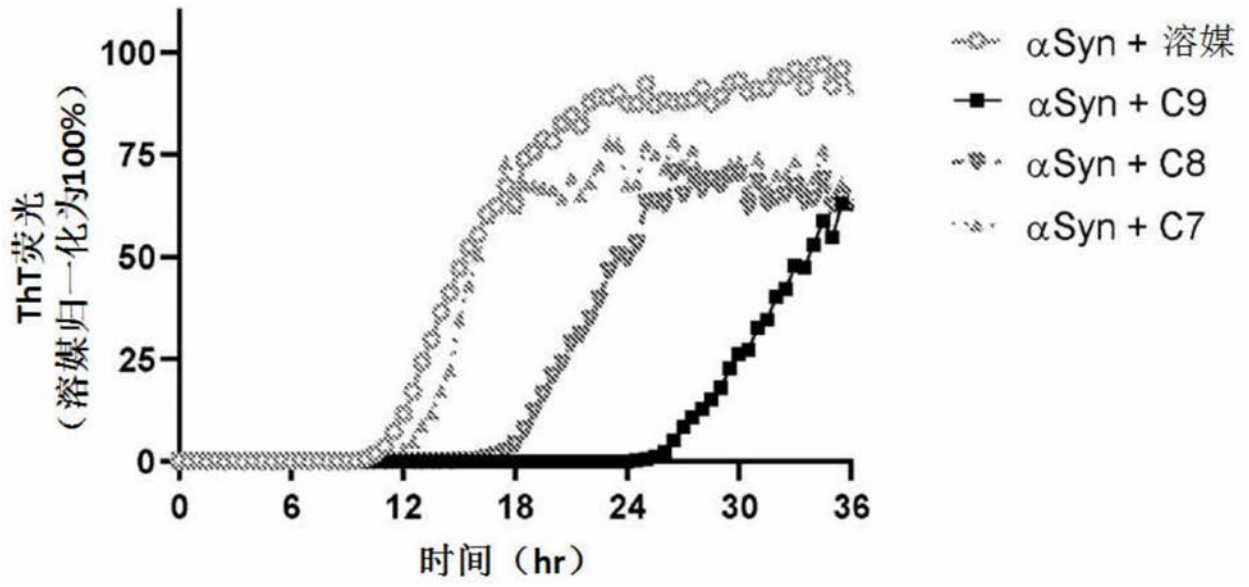


图1A

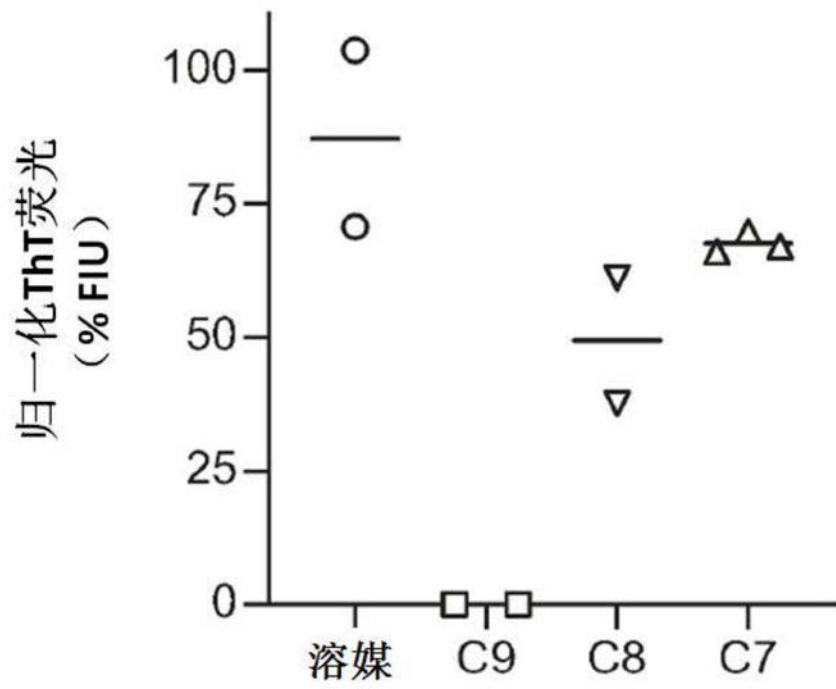


图1B

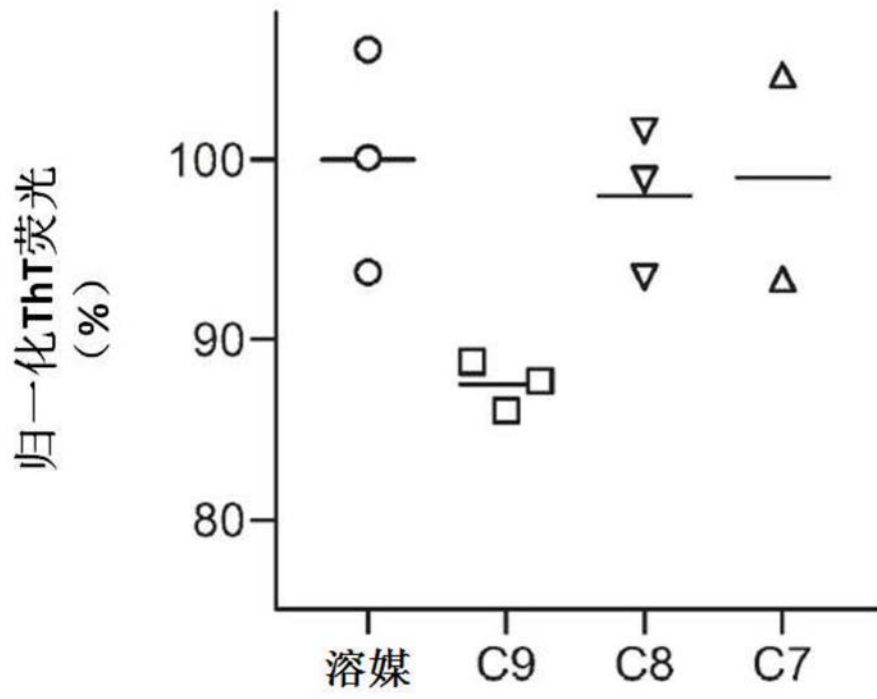


图2

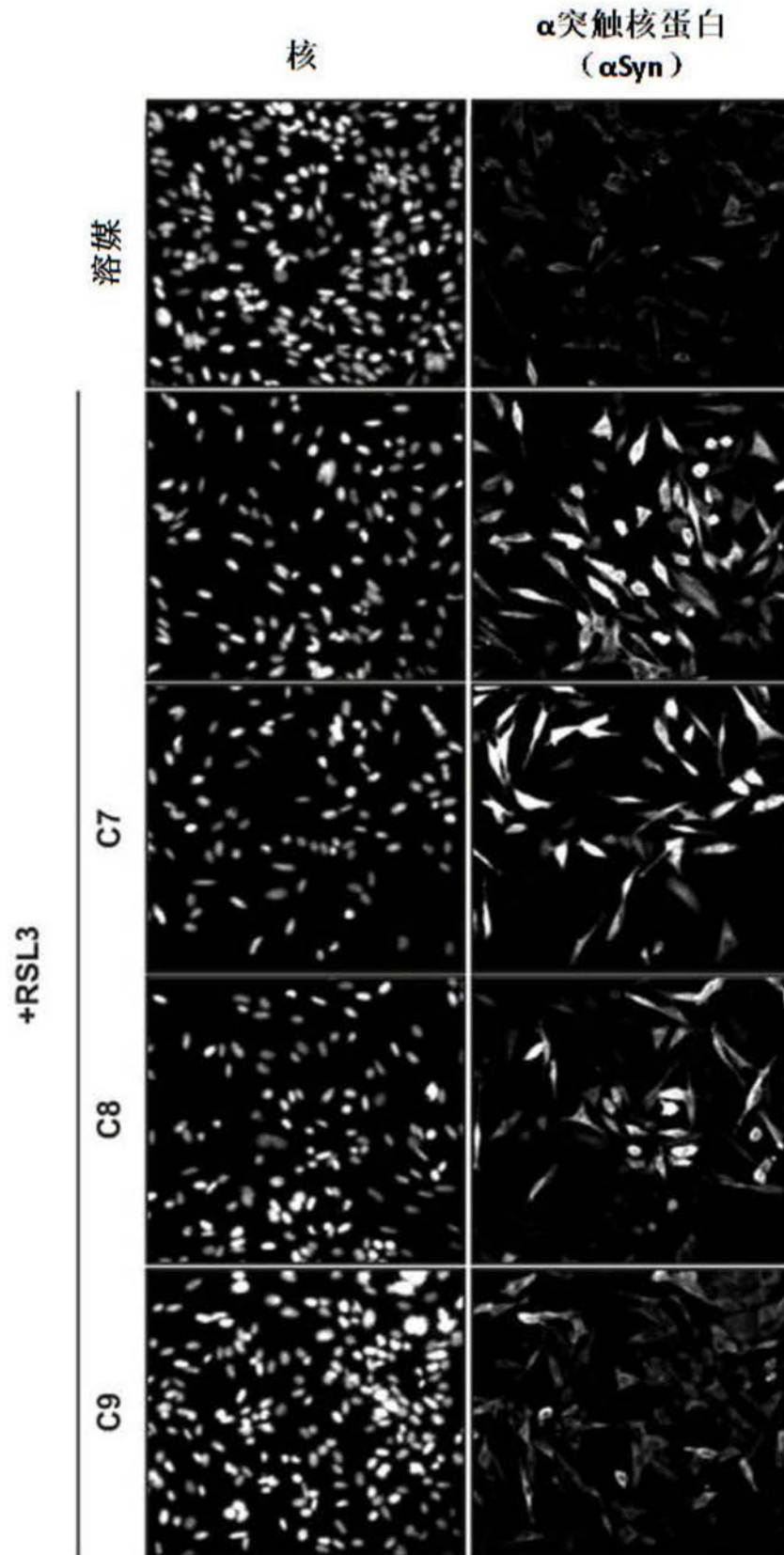


图3A

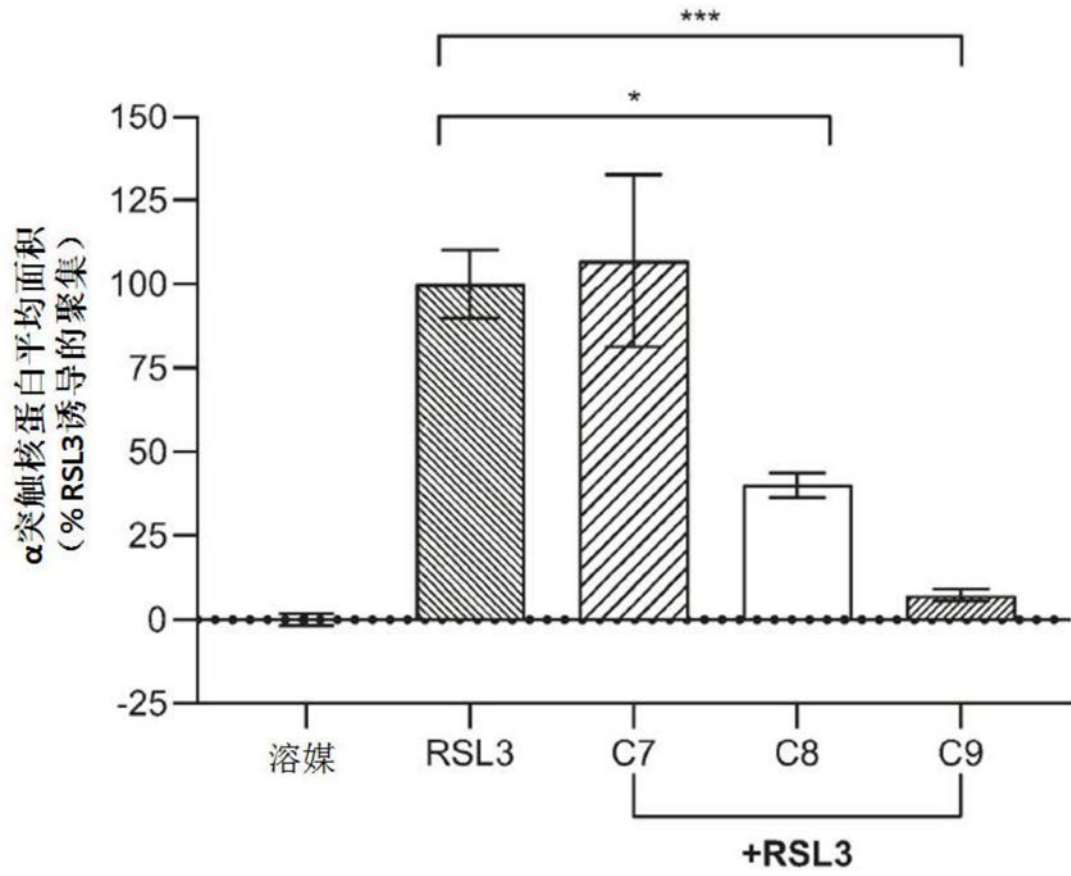


图3B

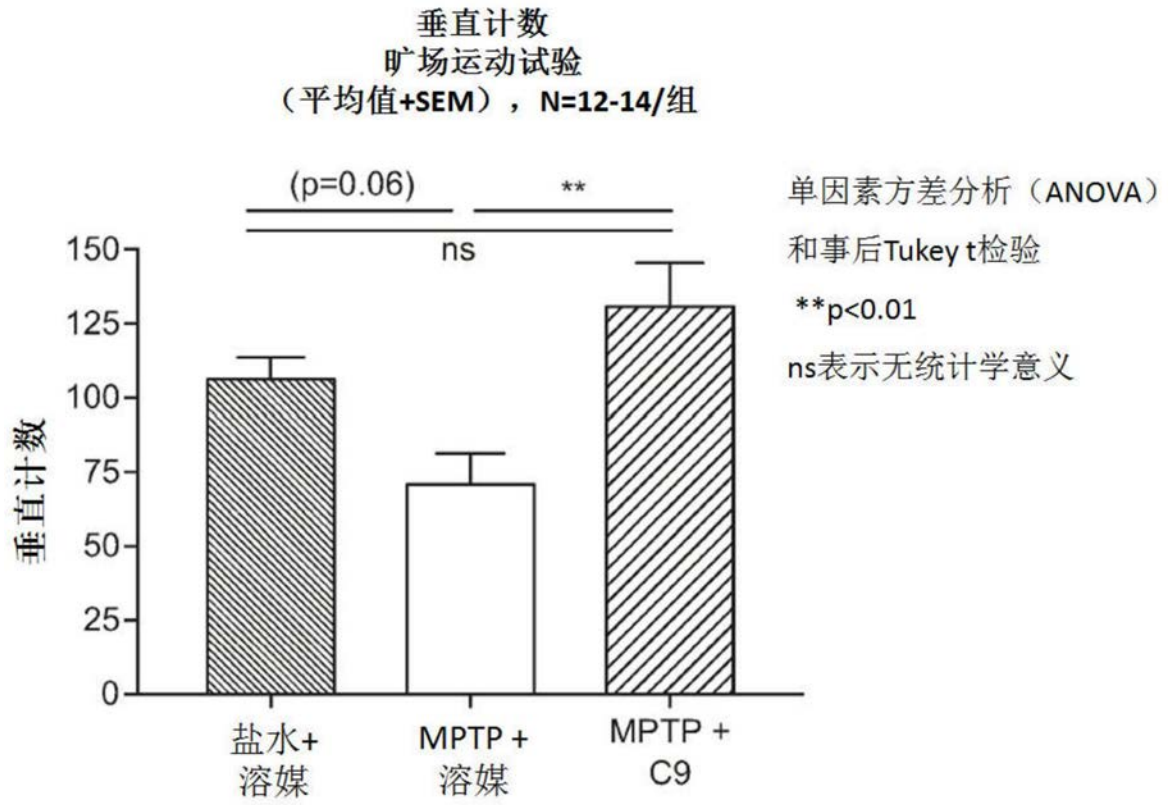


图4A

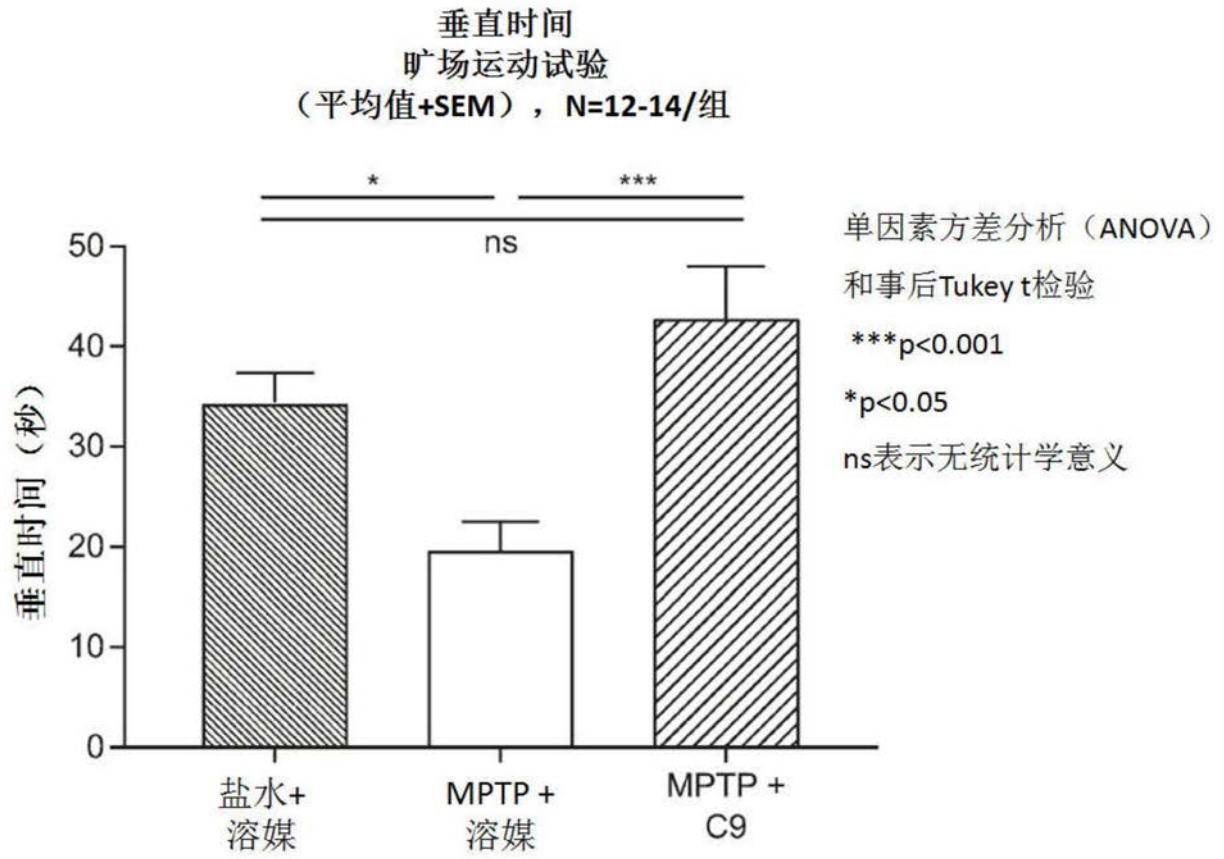


图4B

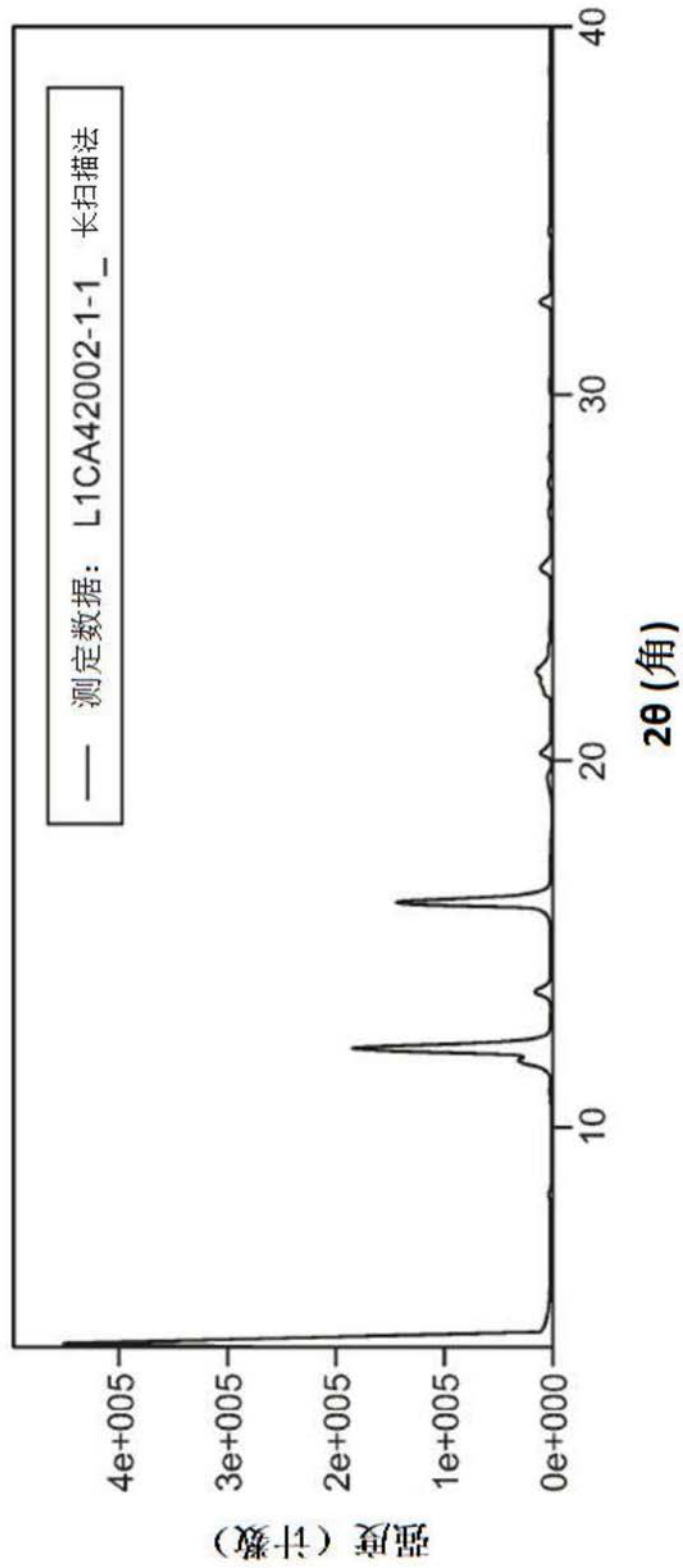


图5

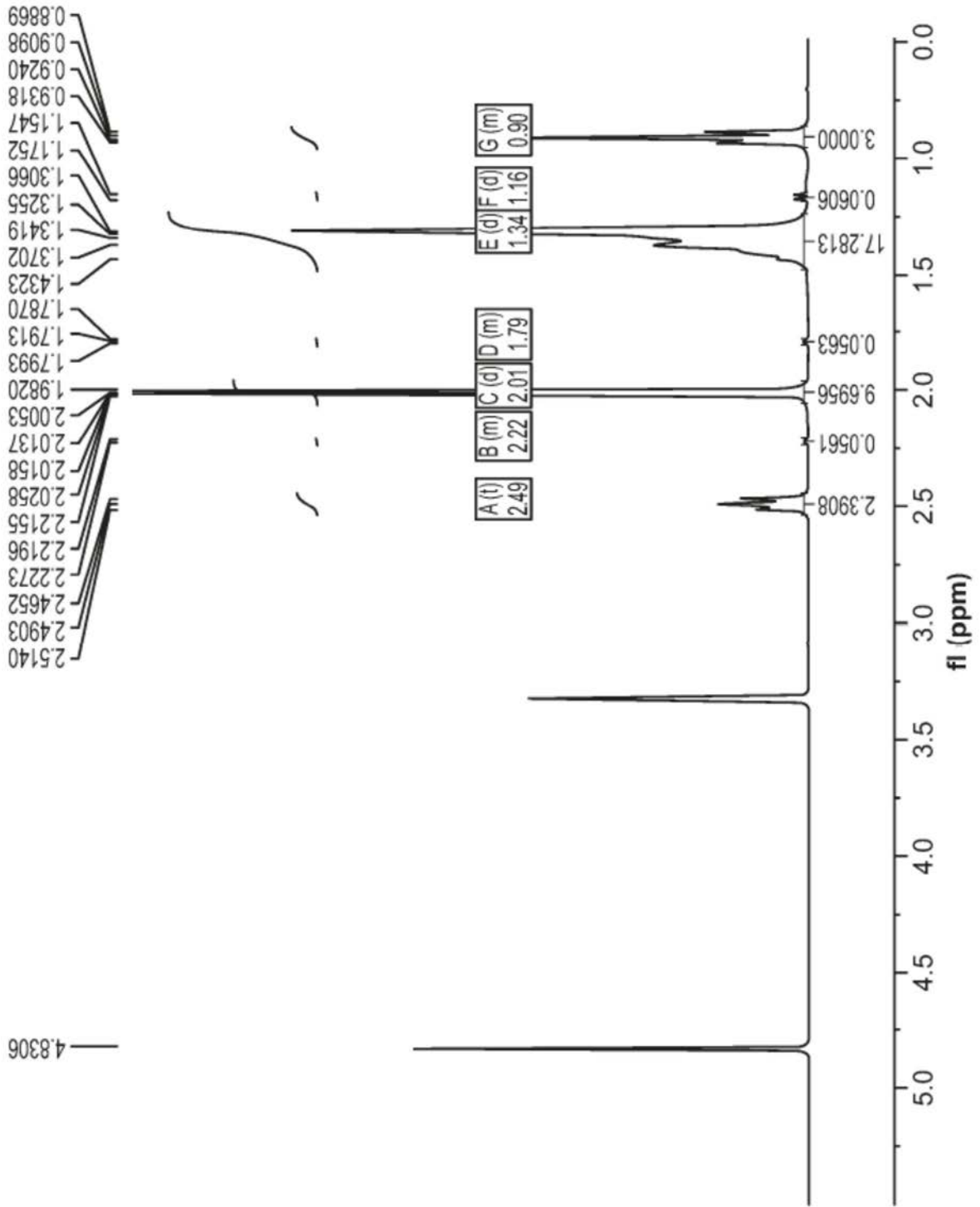


图9

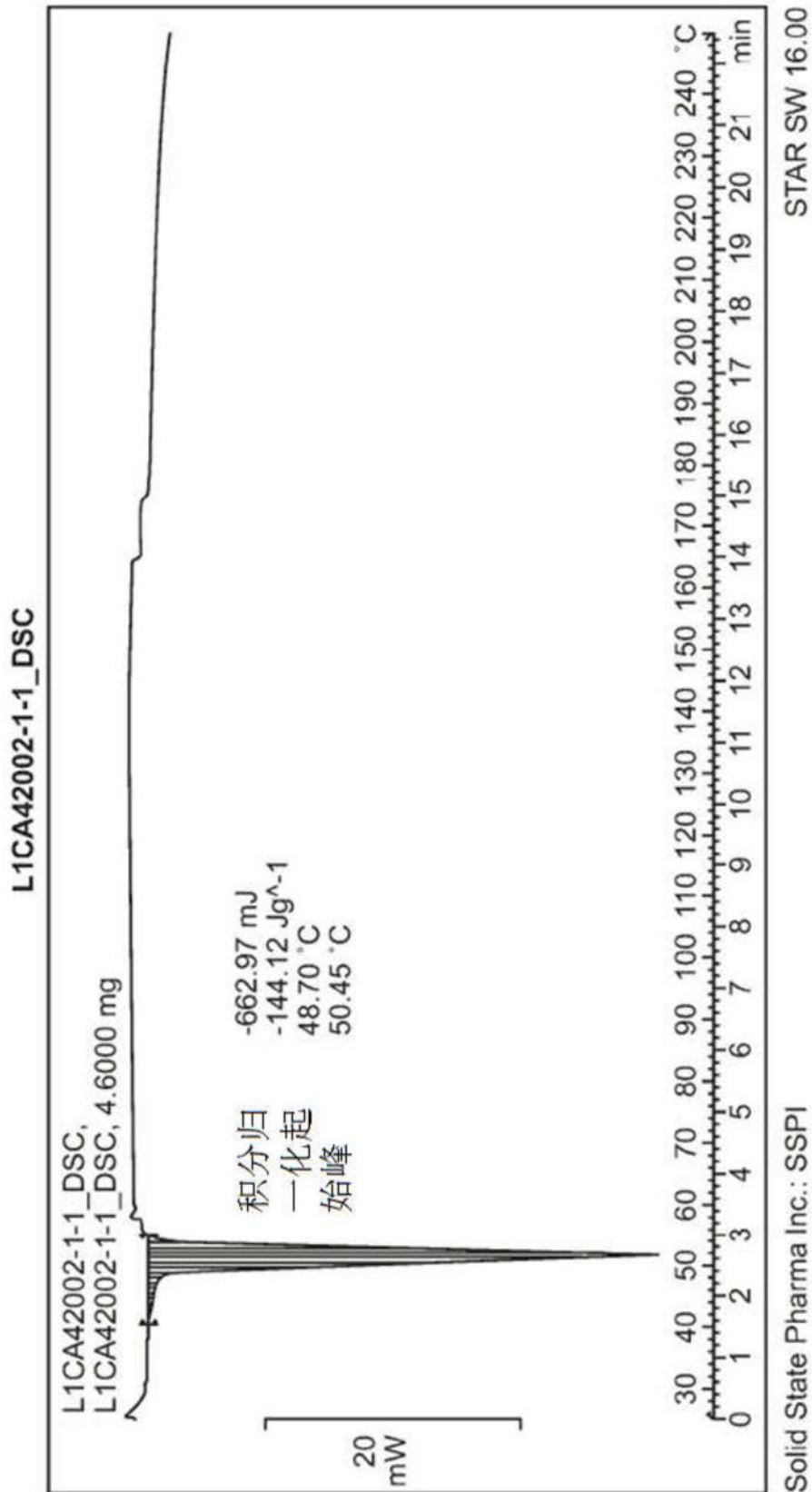


图7

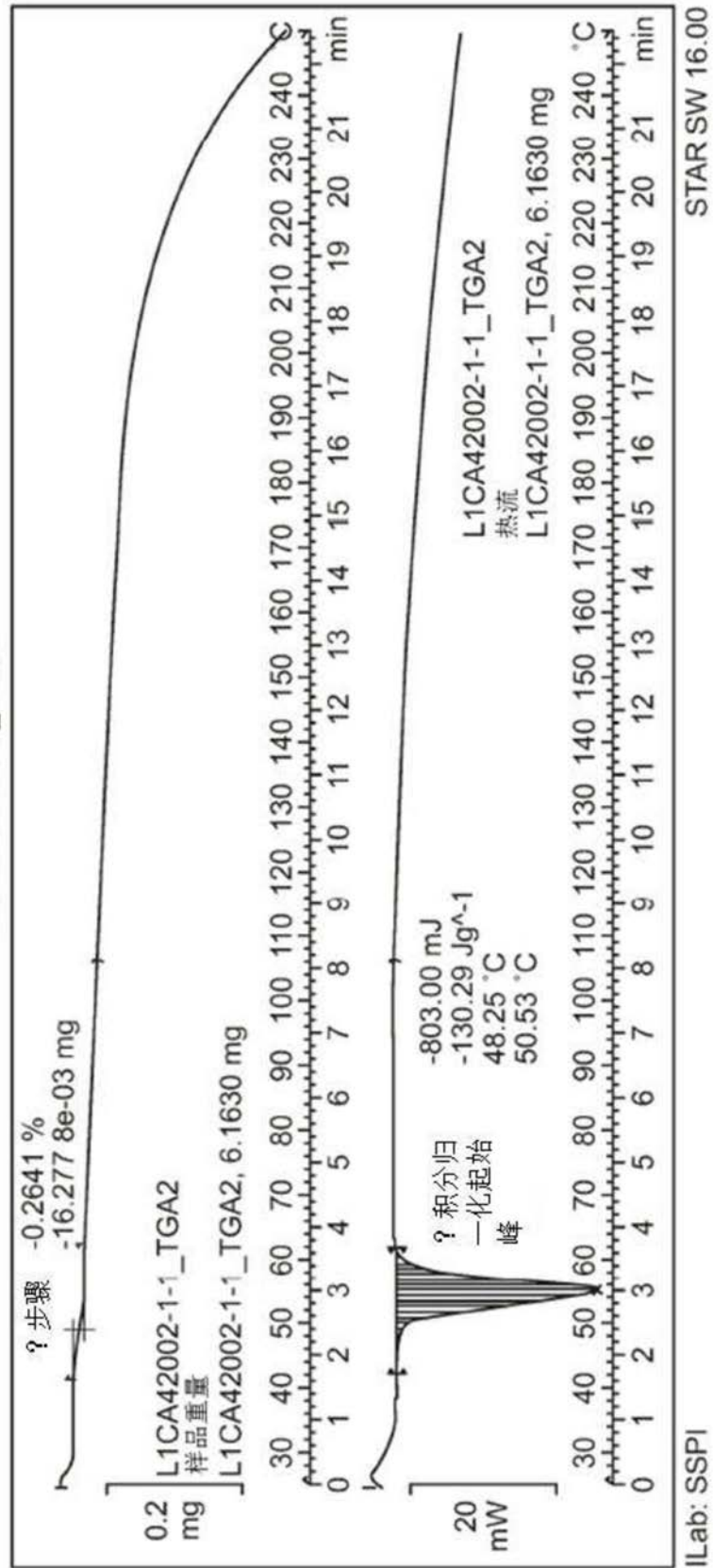


图8

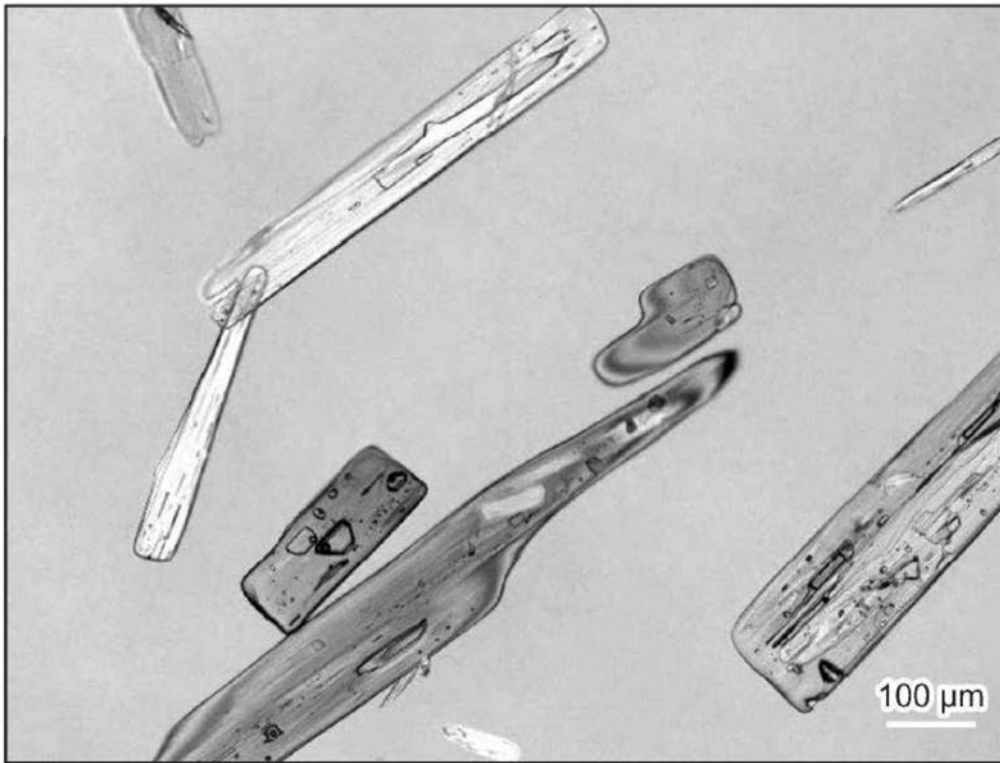


图9A

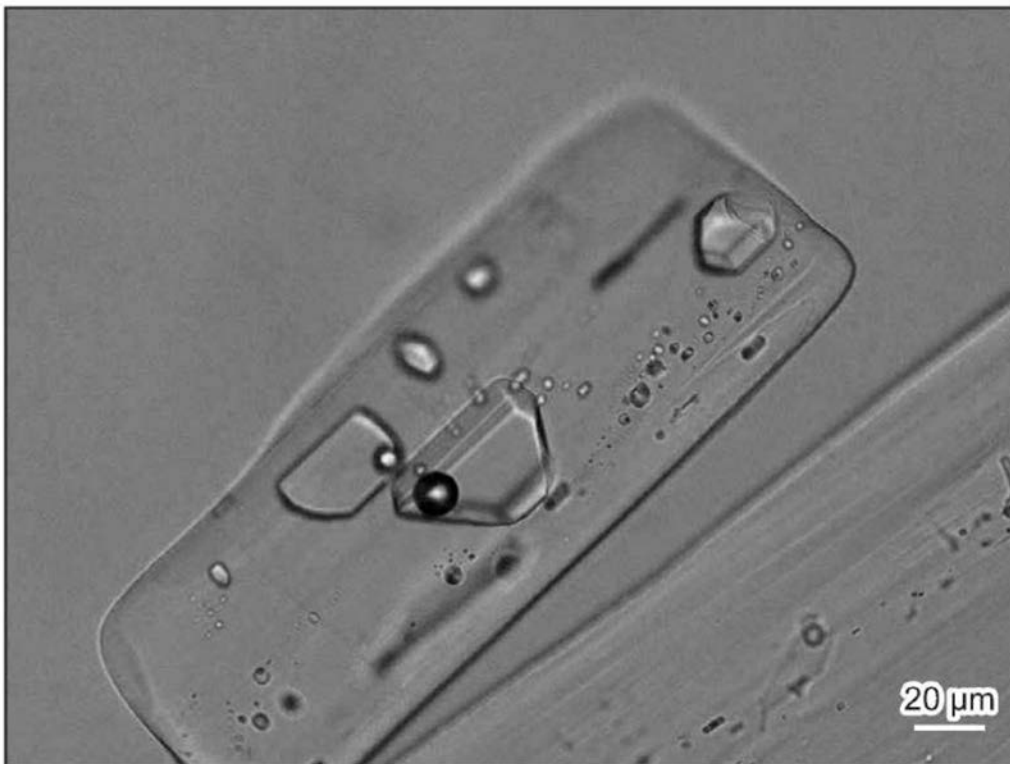


图9B

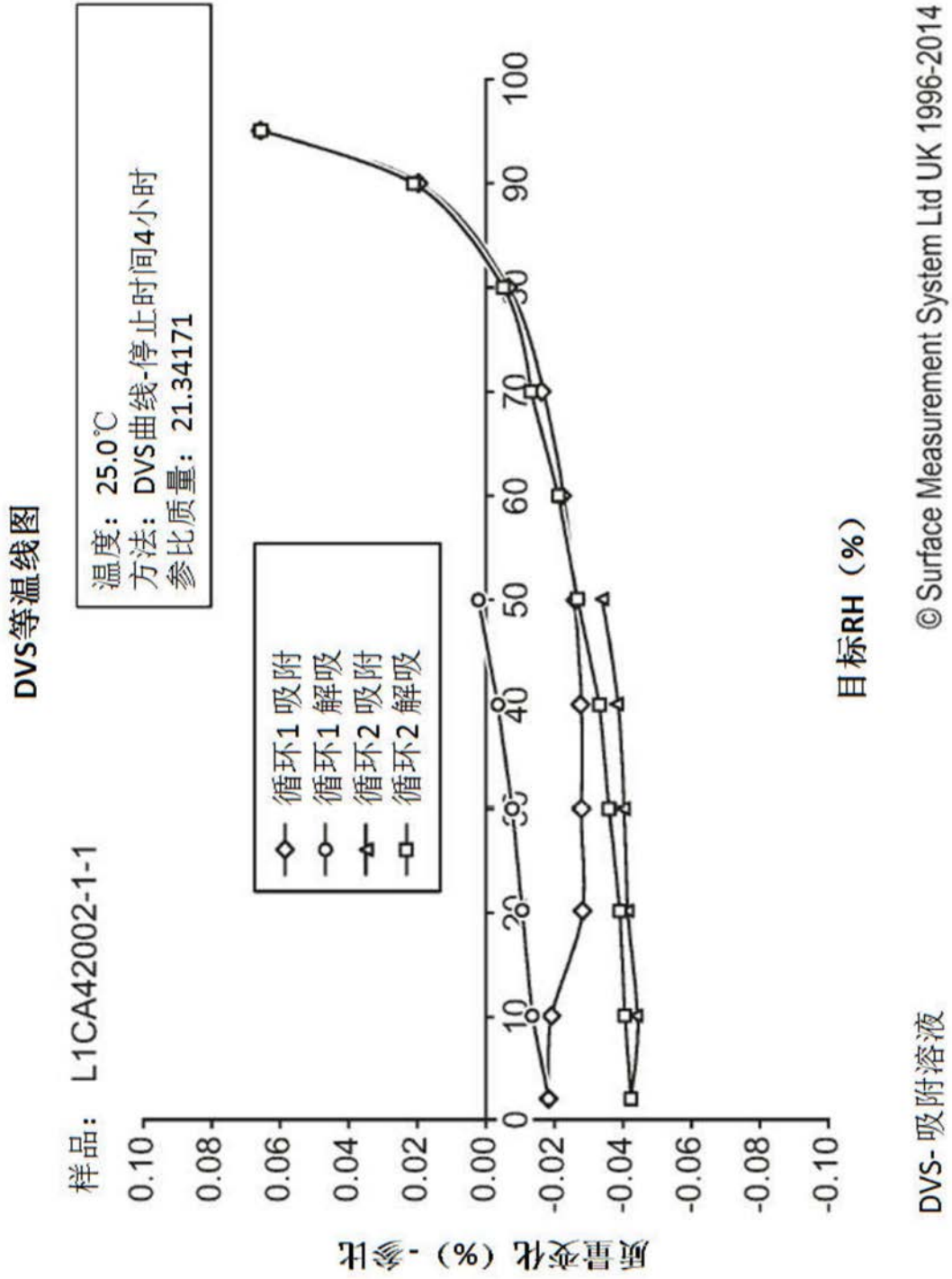


图10

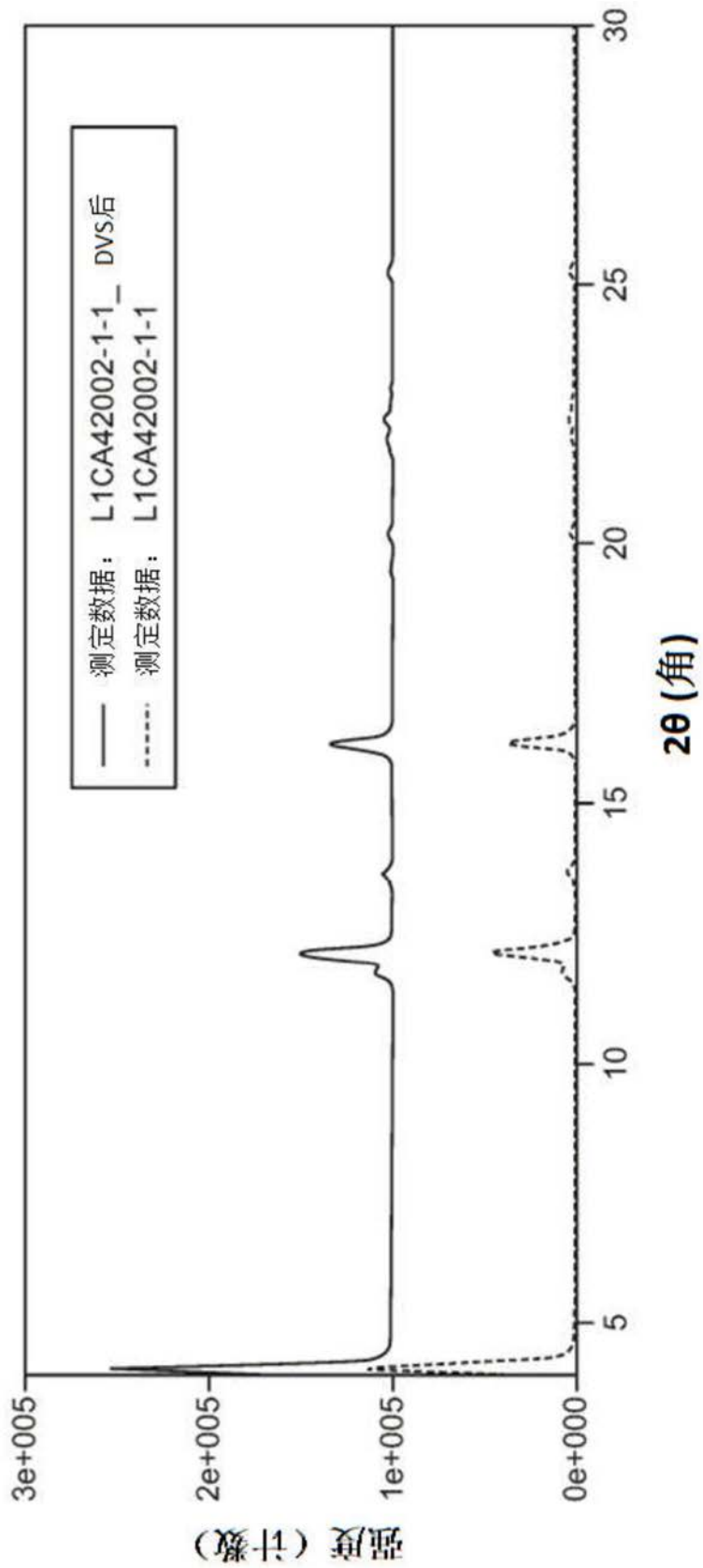


图11

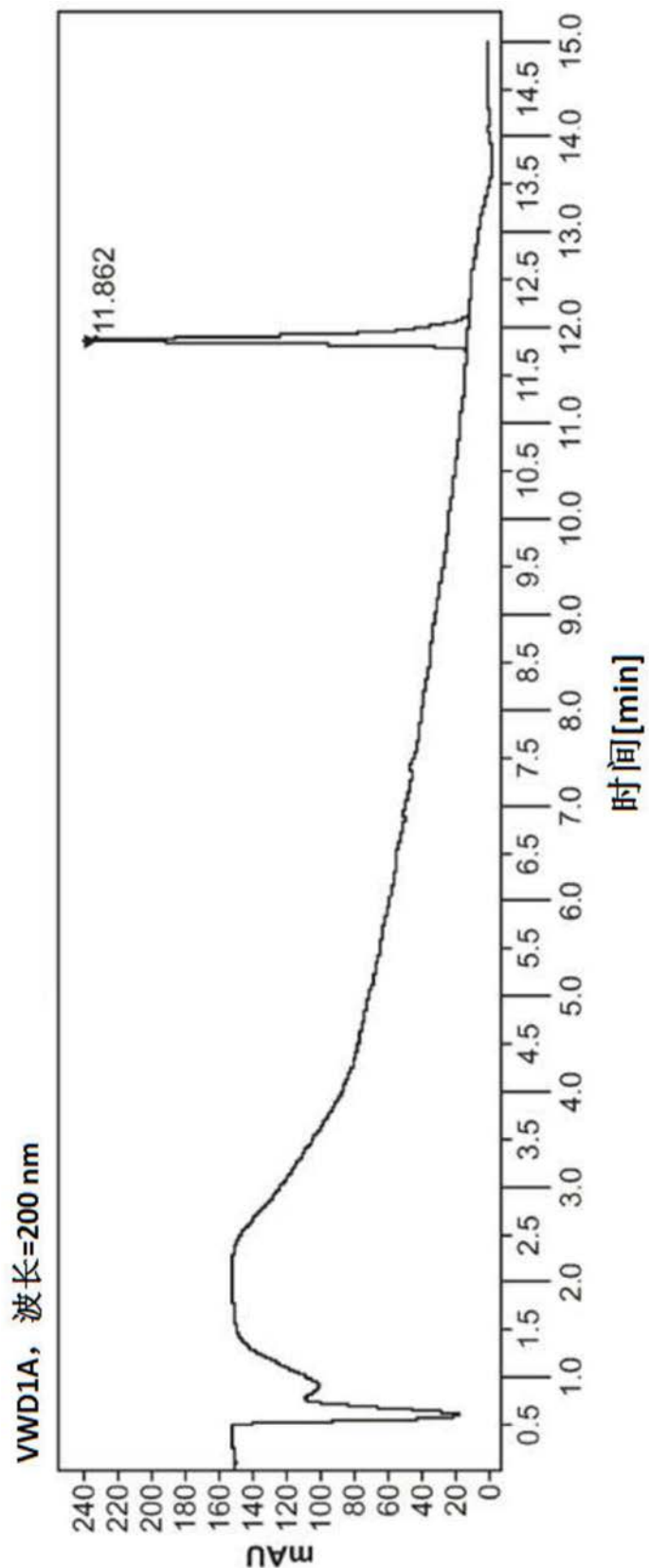


图12

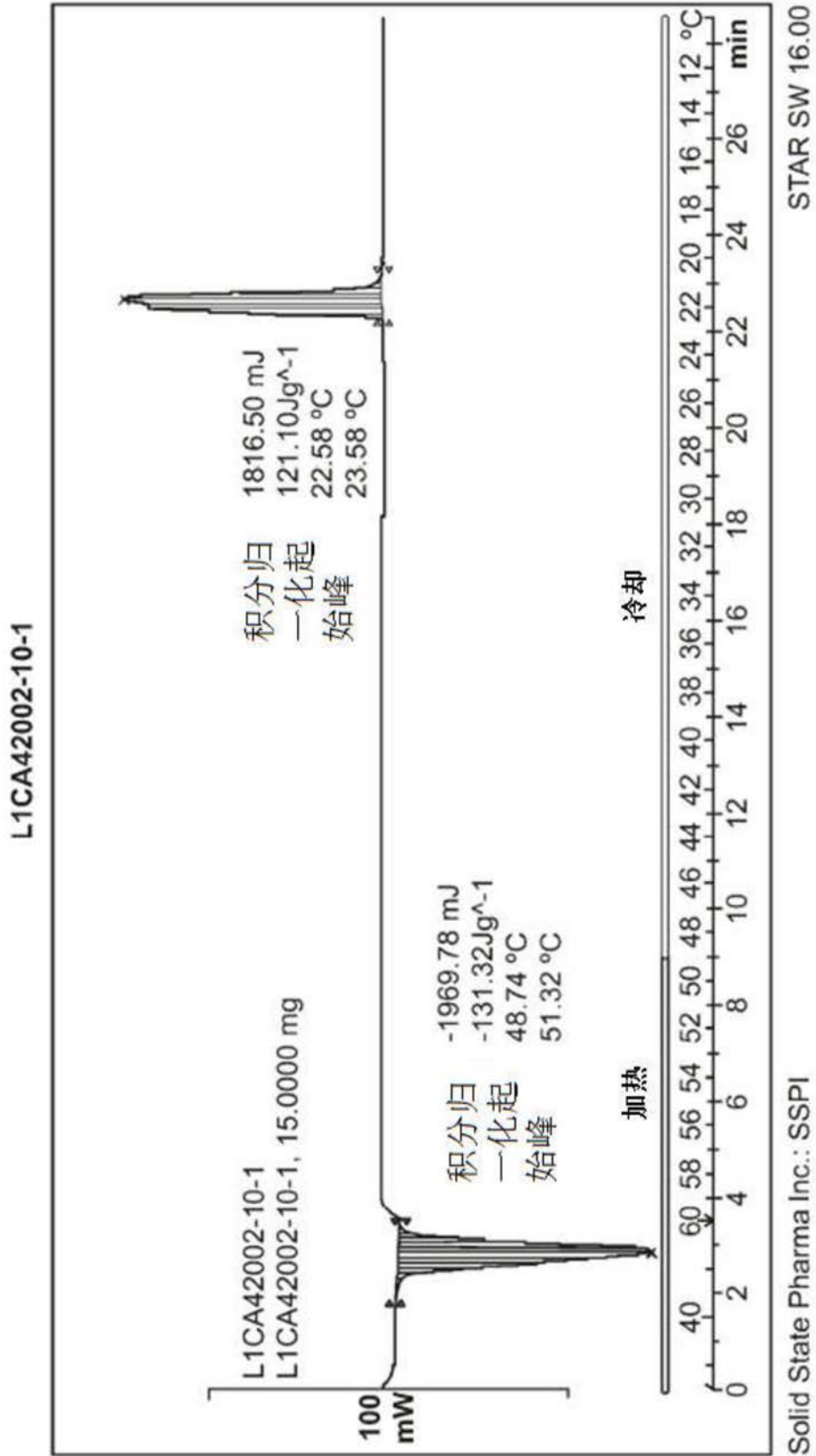


图13

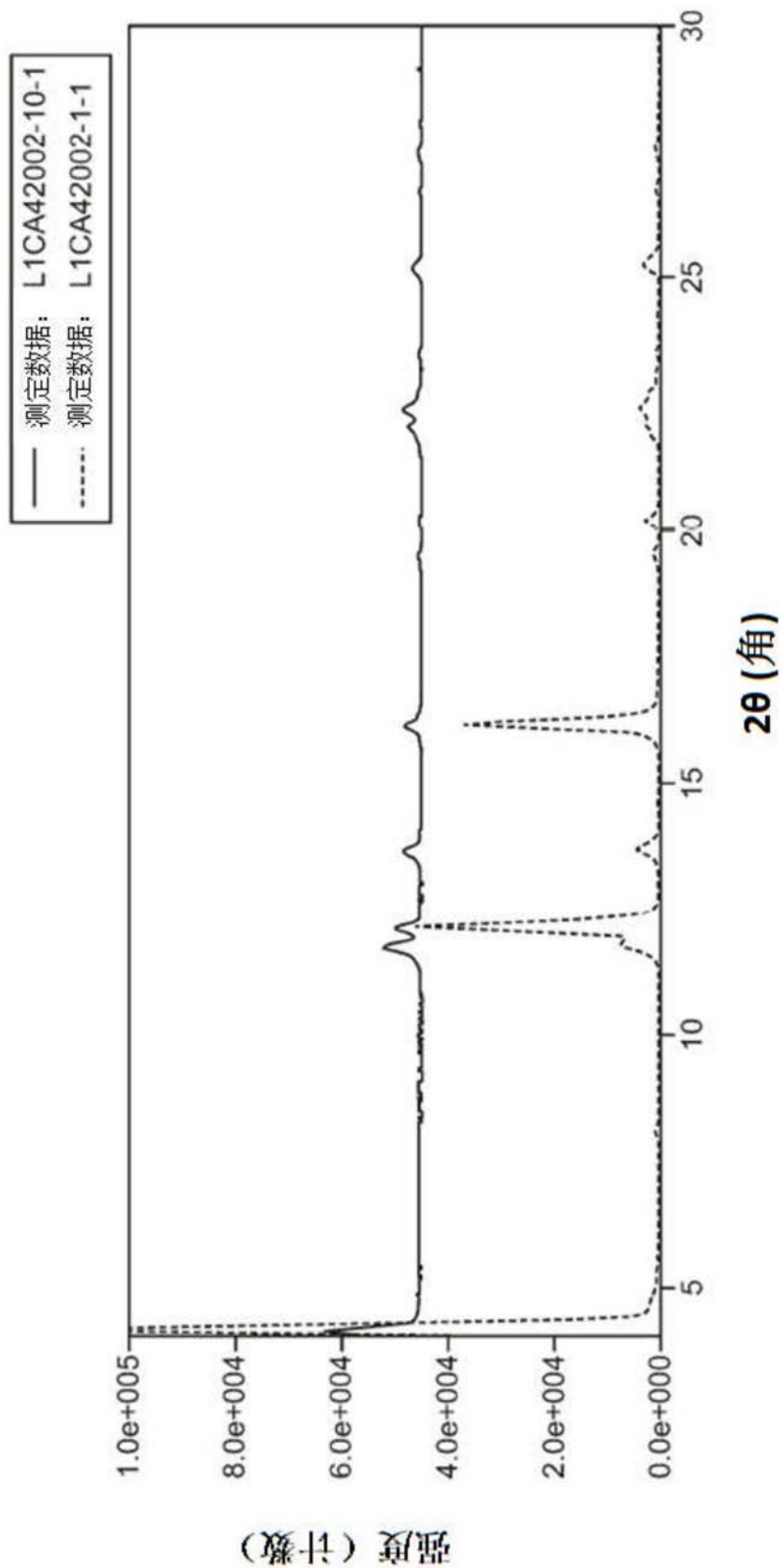


图14

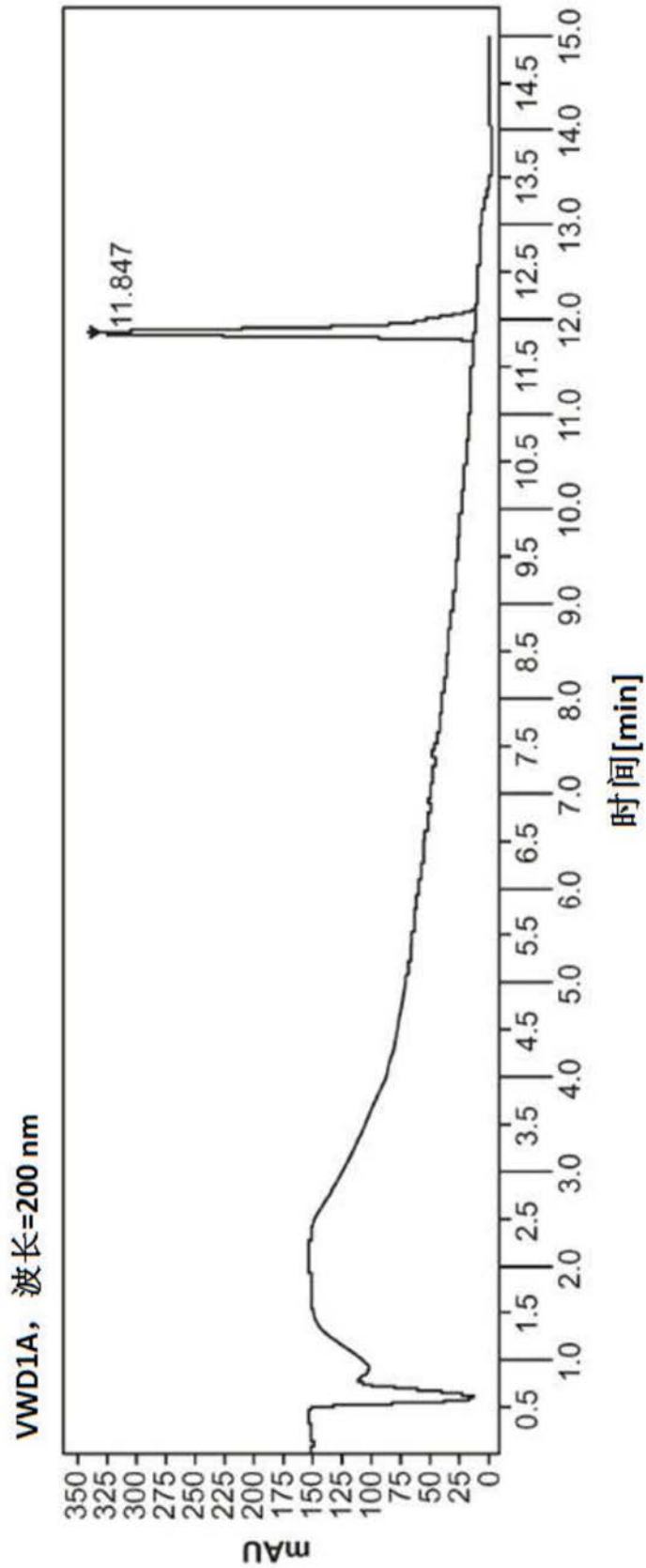


图15

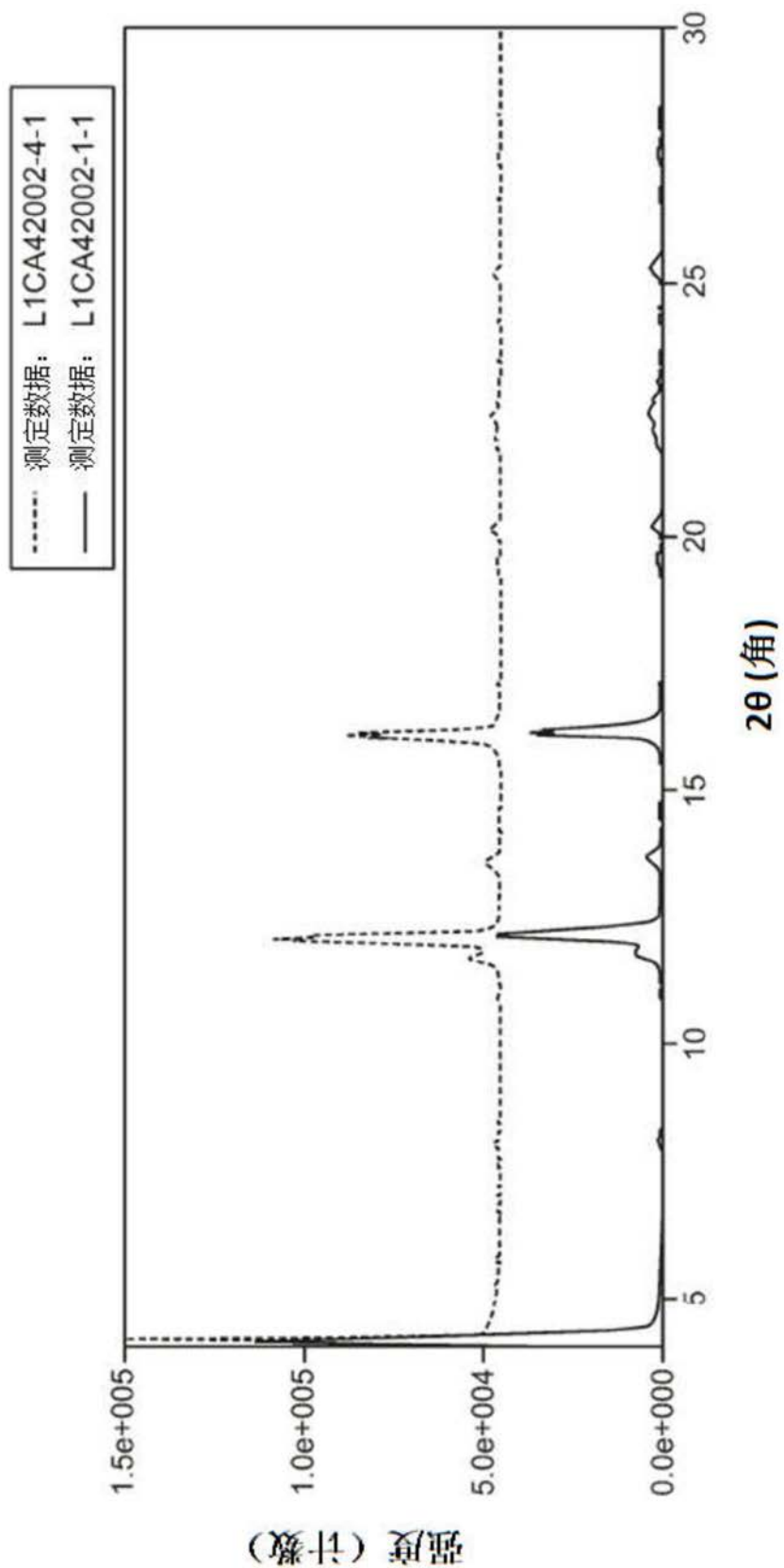


图16

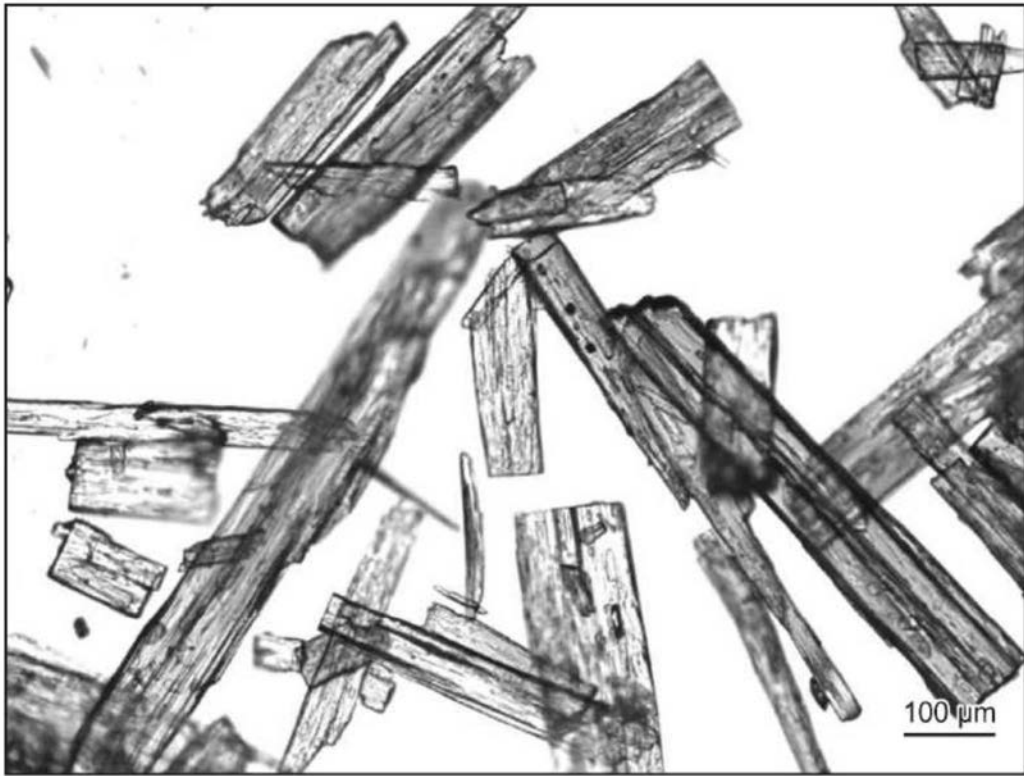


图17A

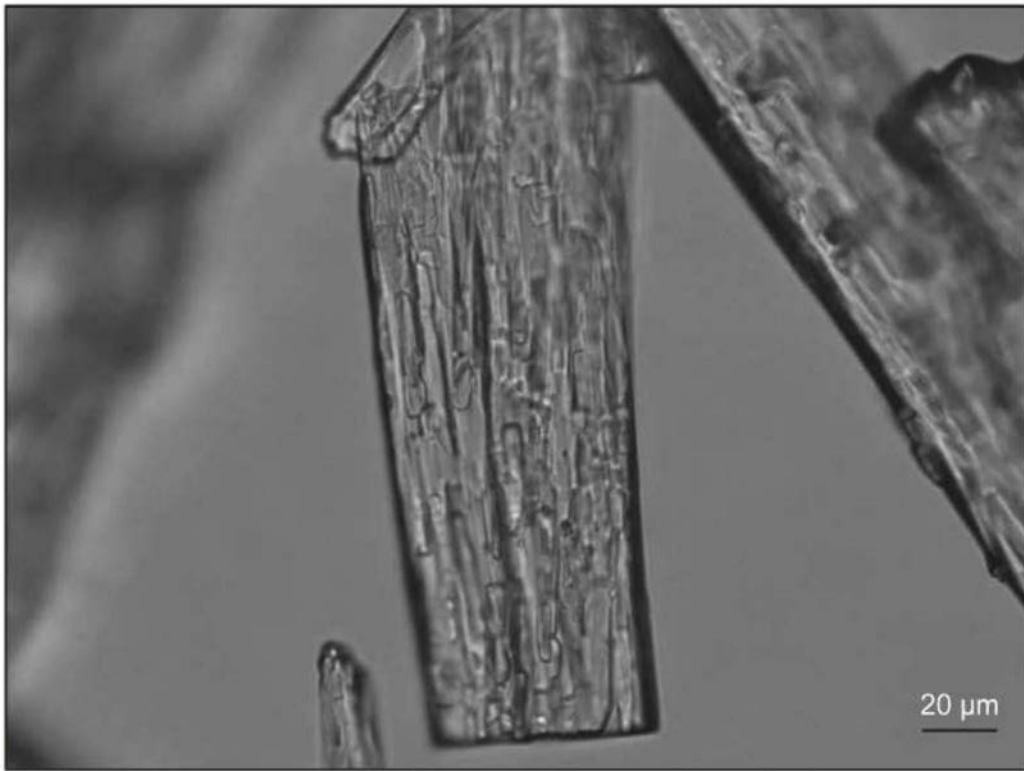


图17B

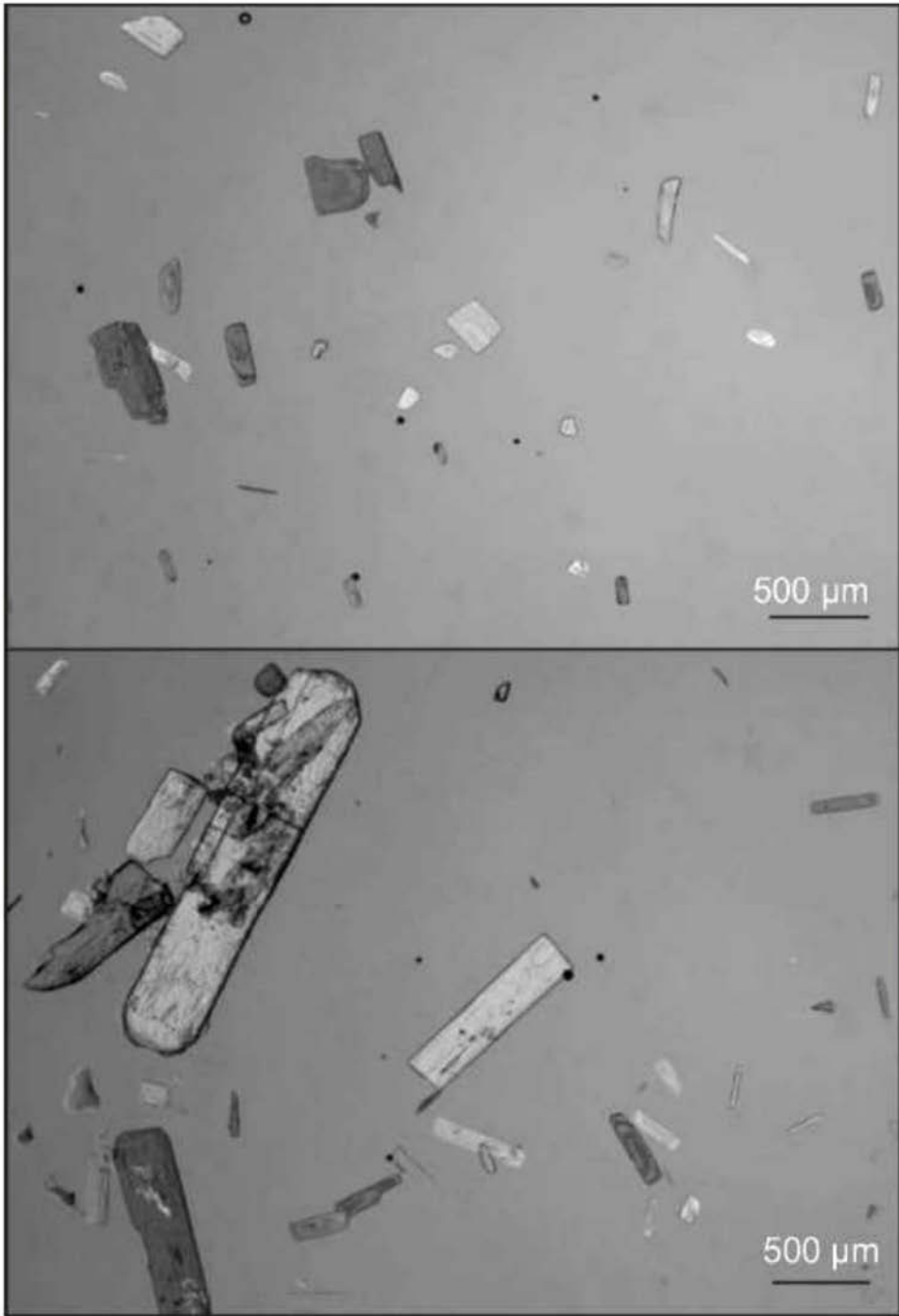


图18

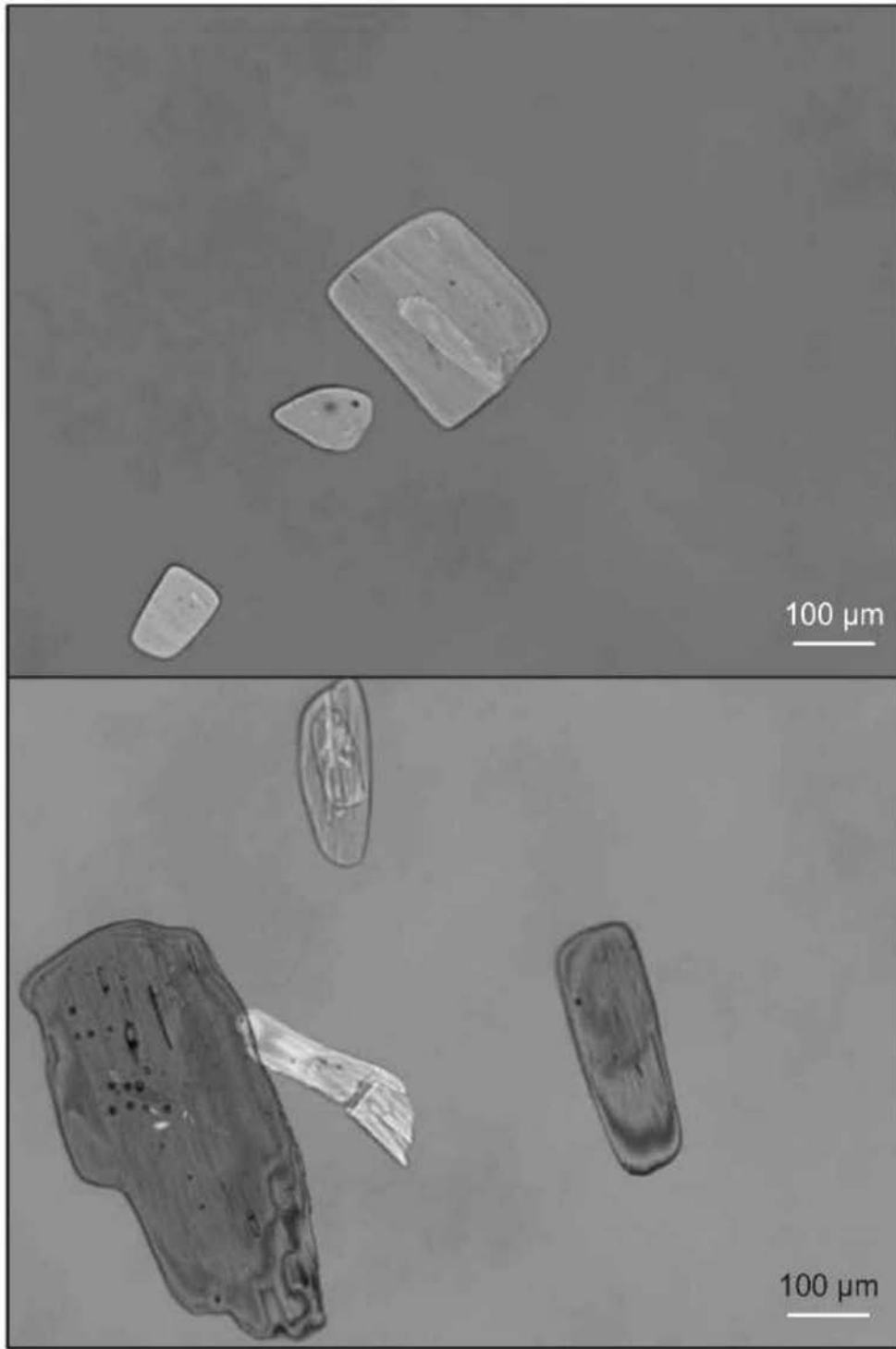


图19

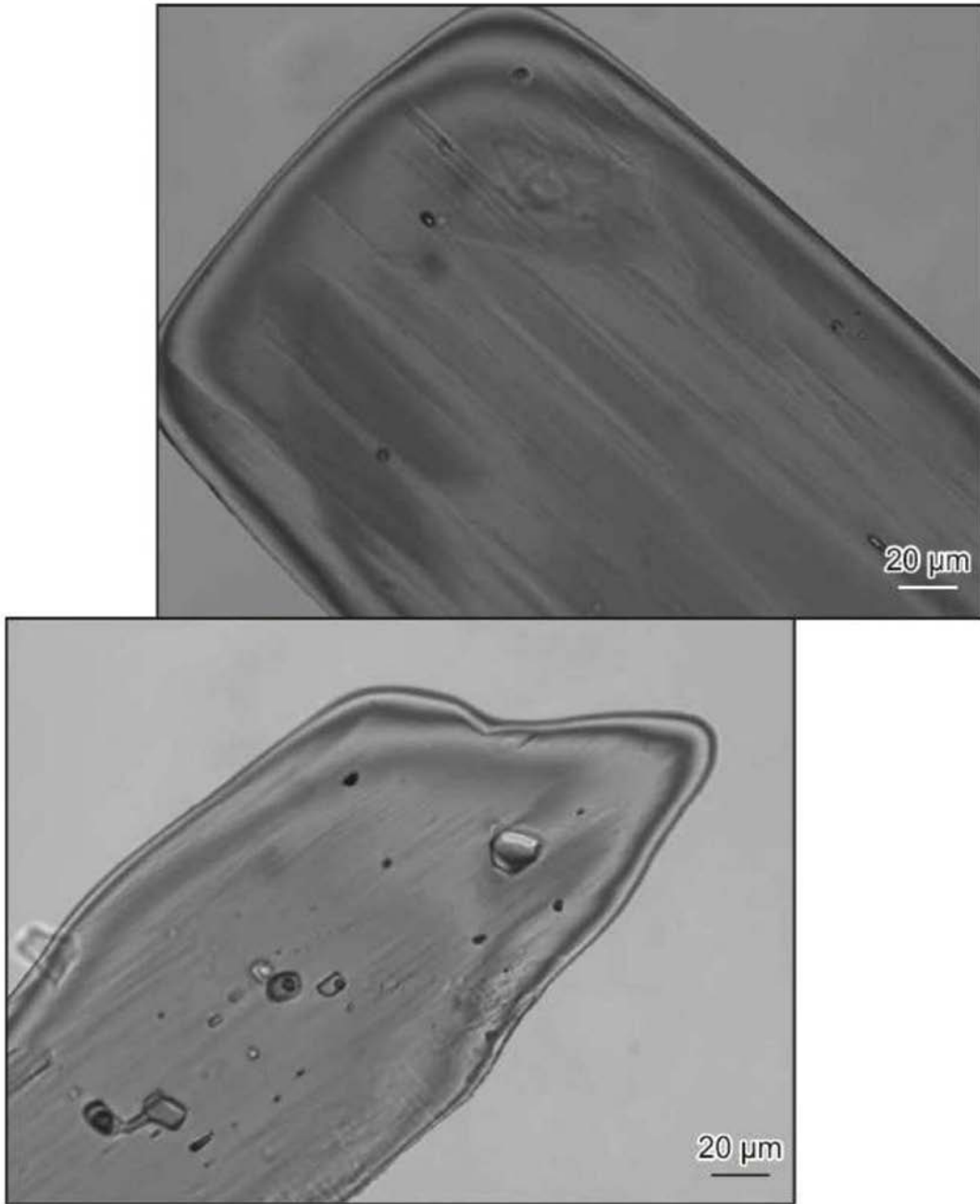


图20

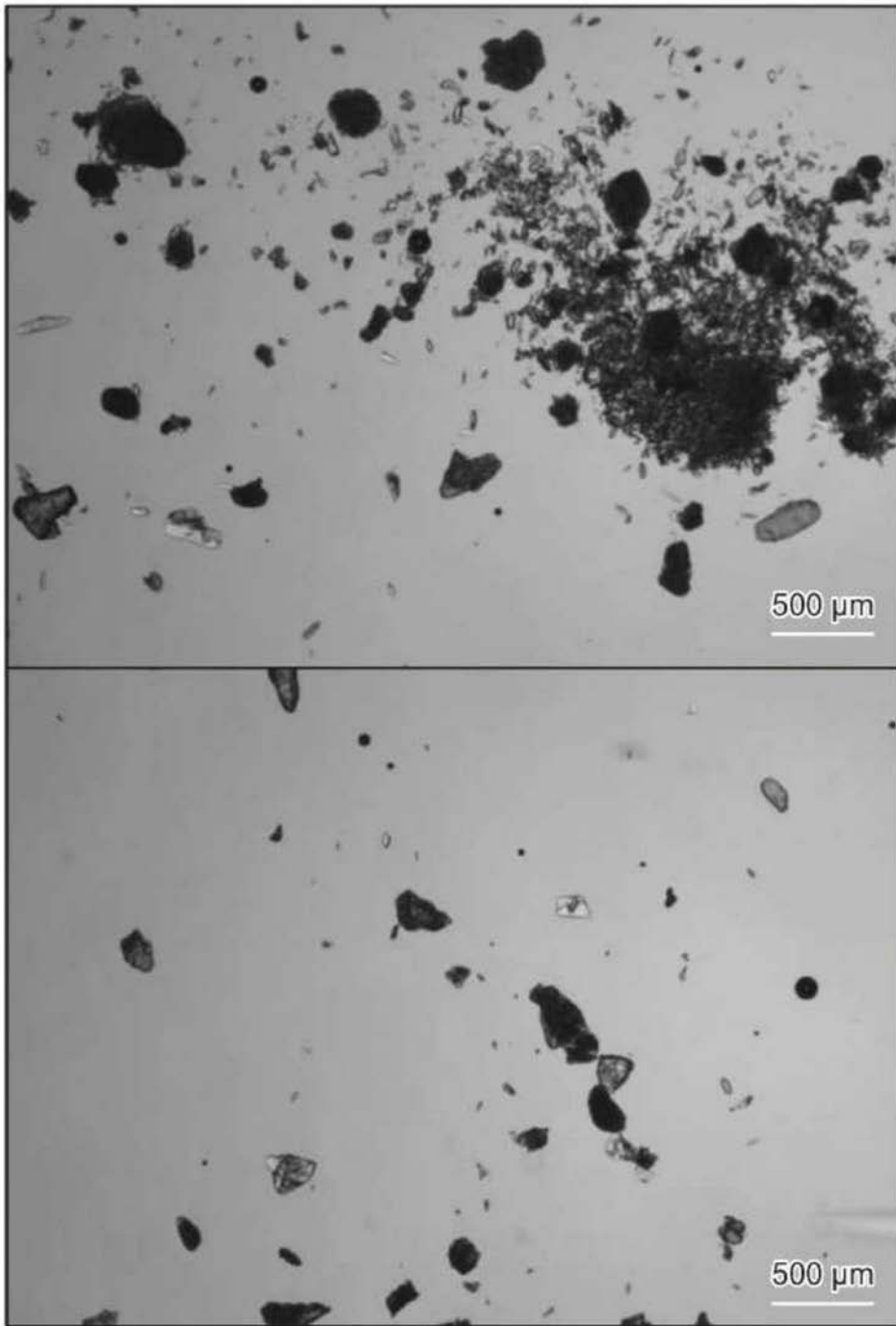


图21

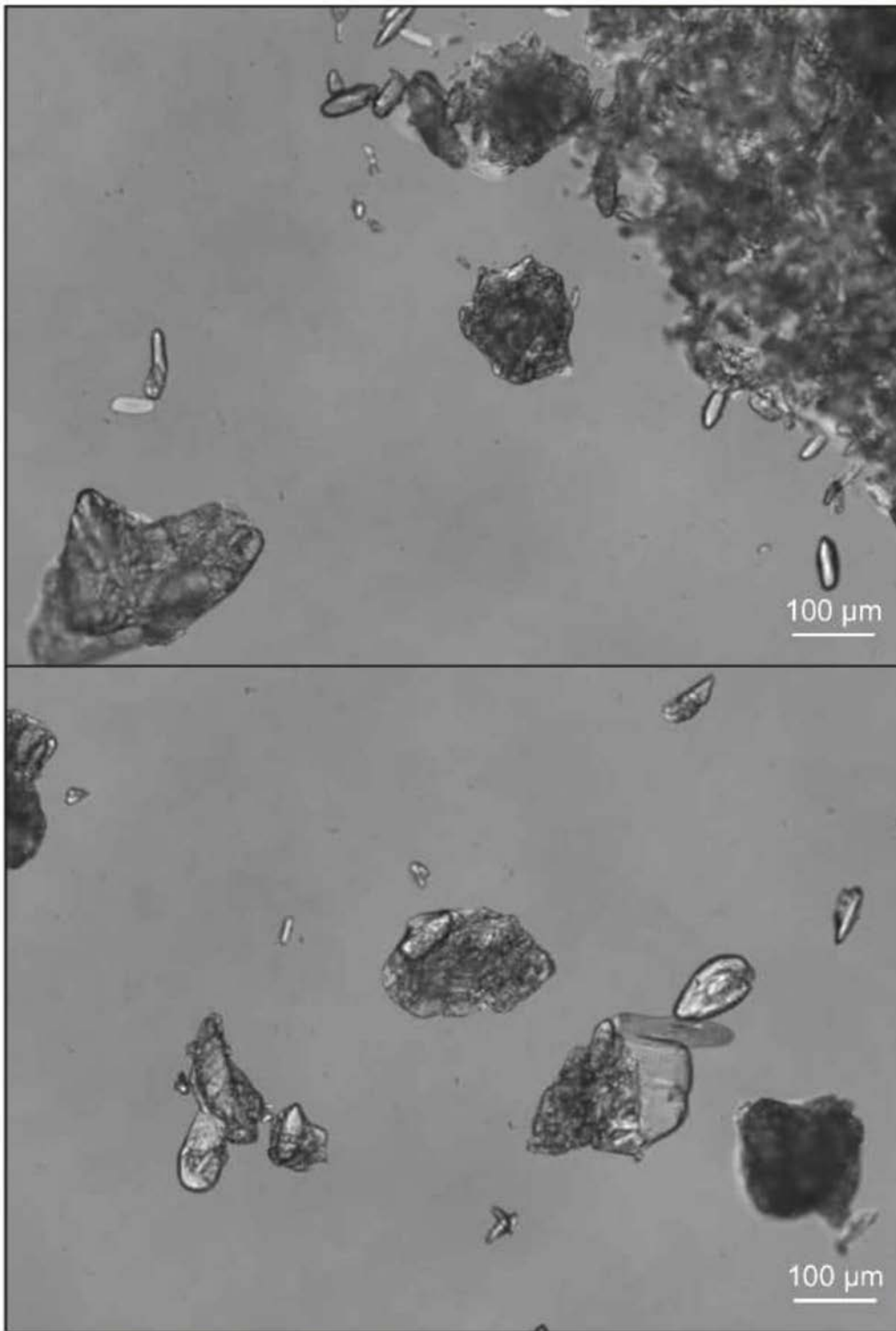


图22



图23A

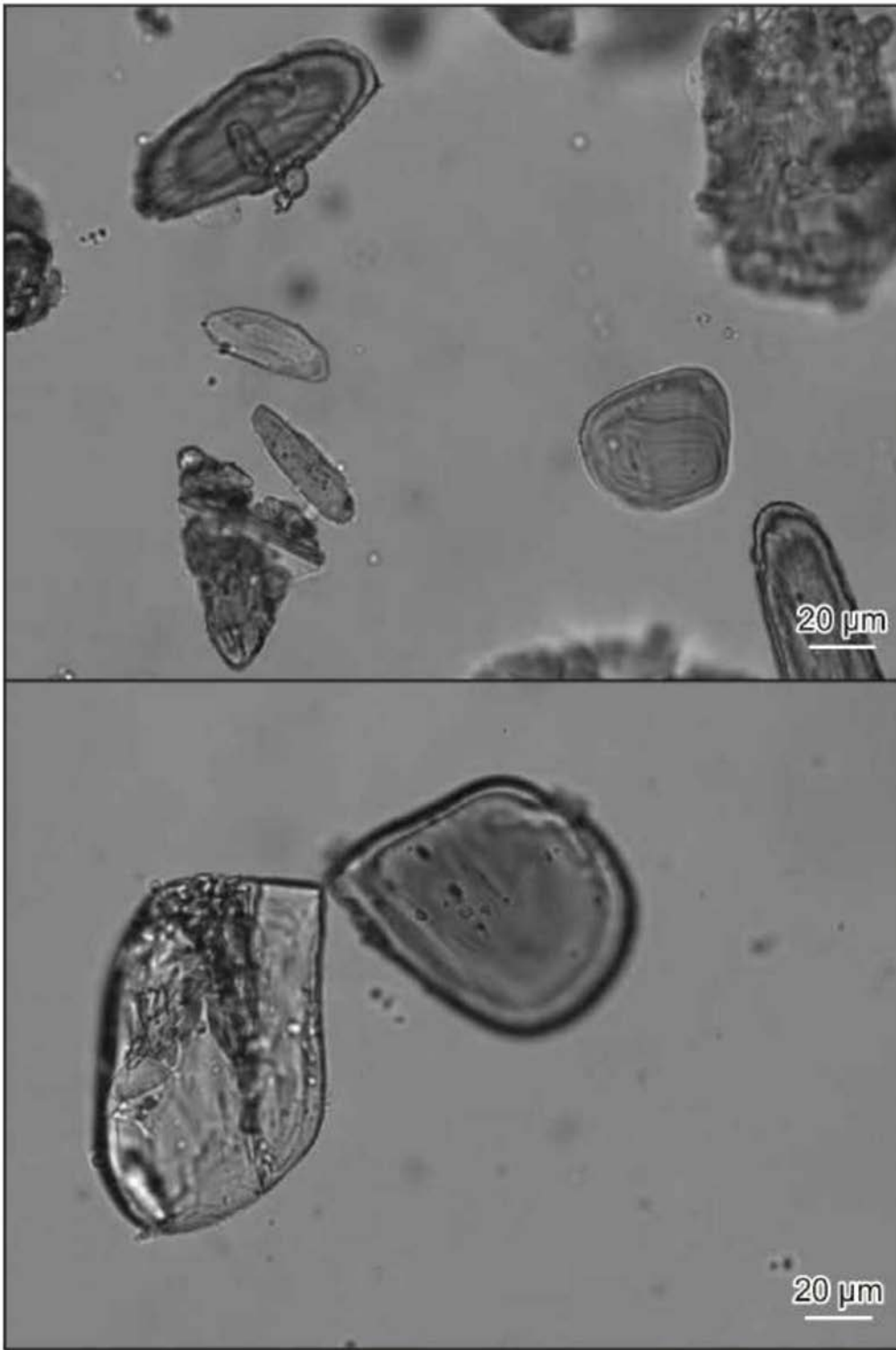


图23B

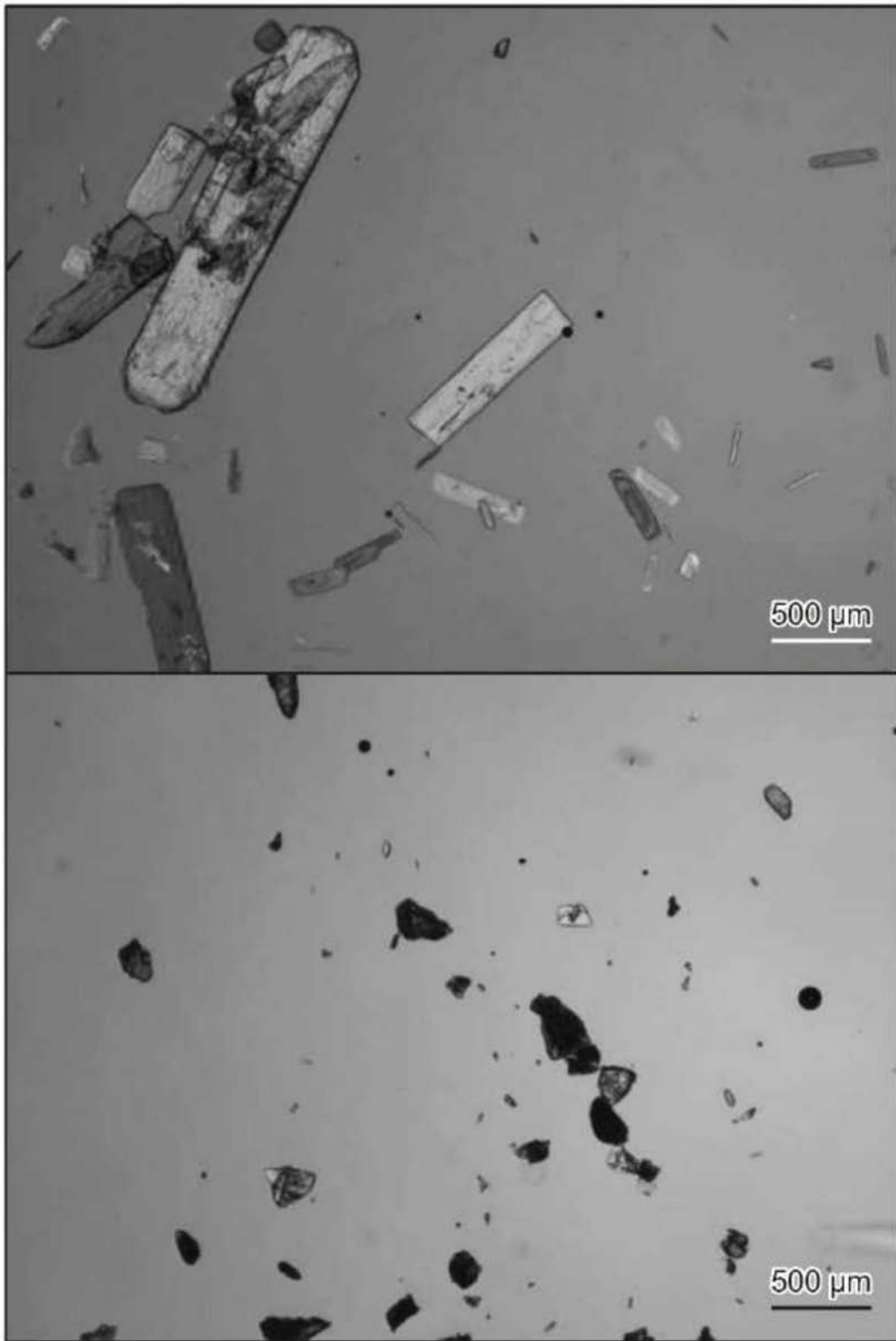


图24

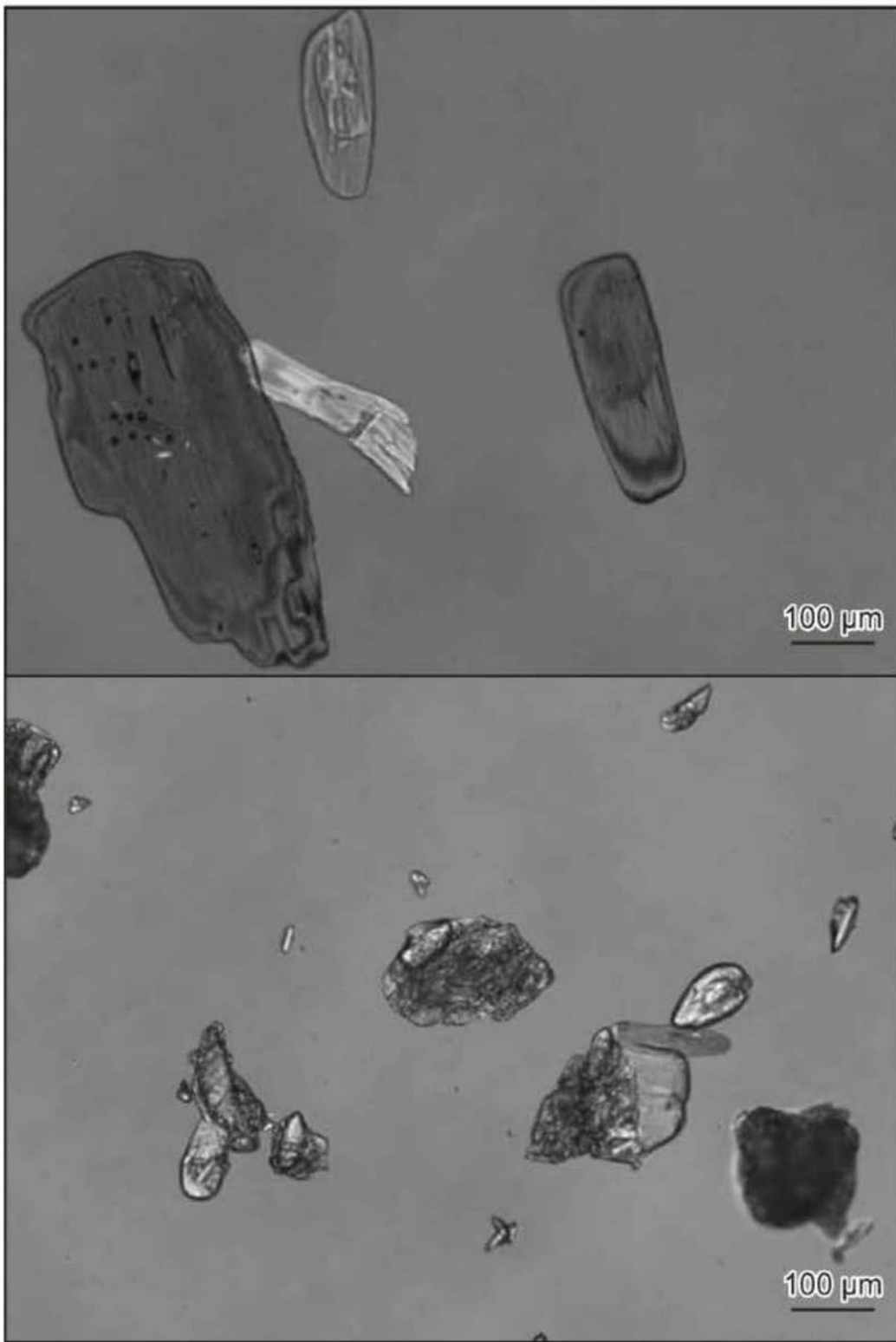


图25

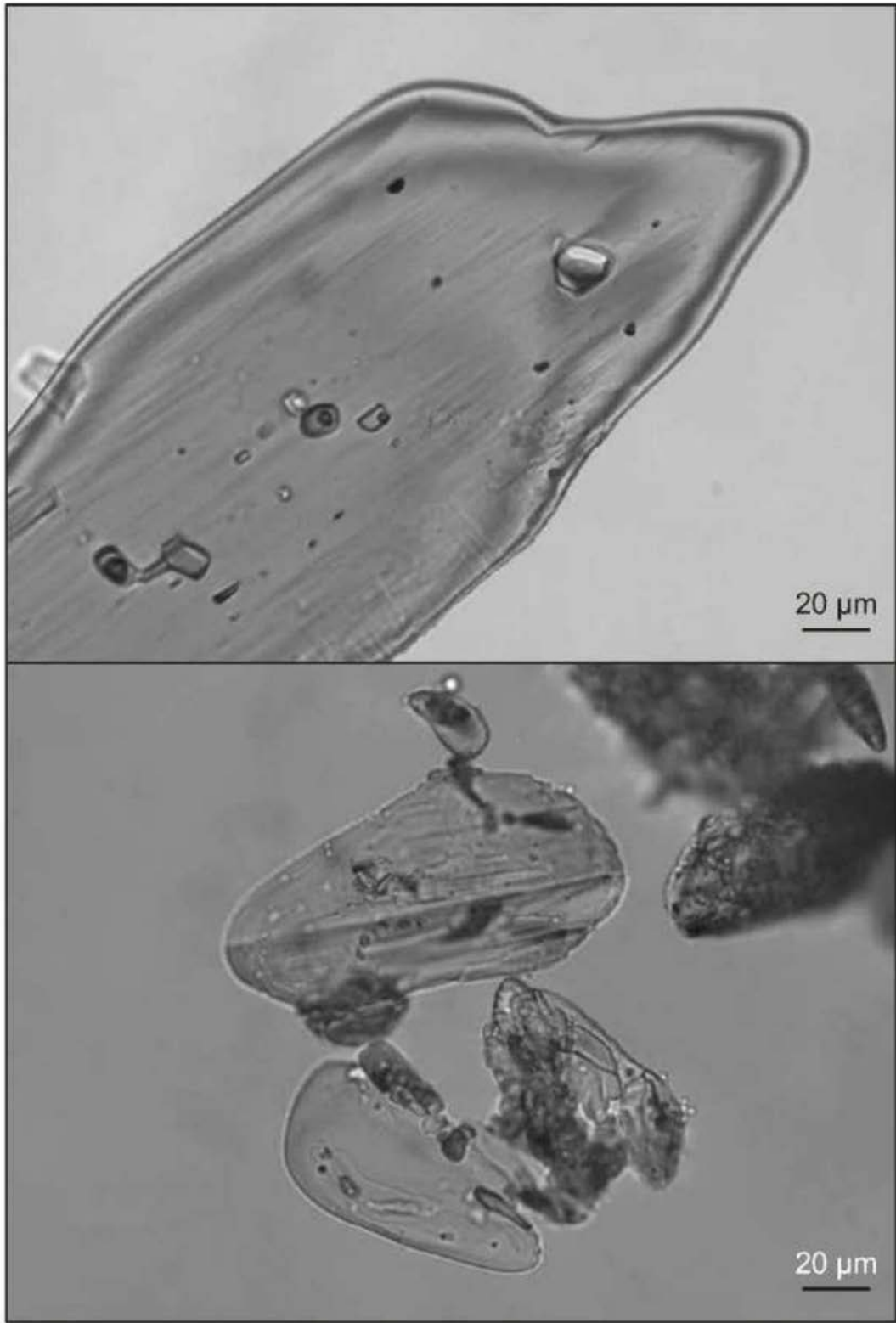


图26

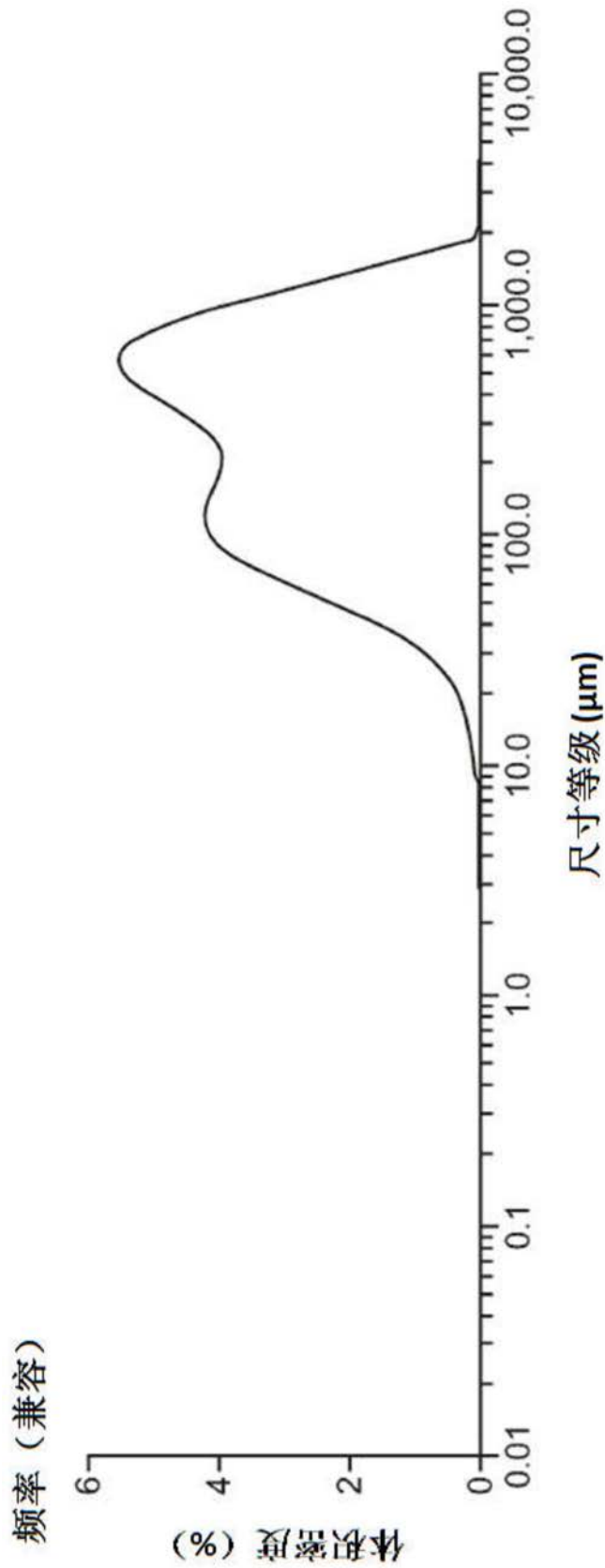


图27

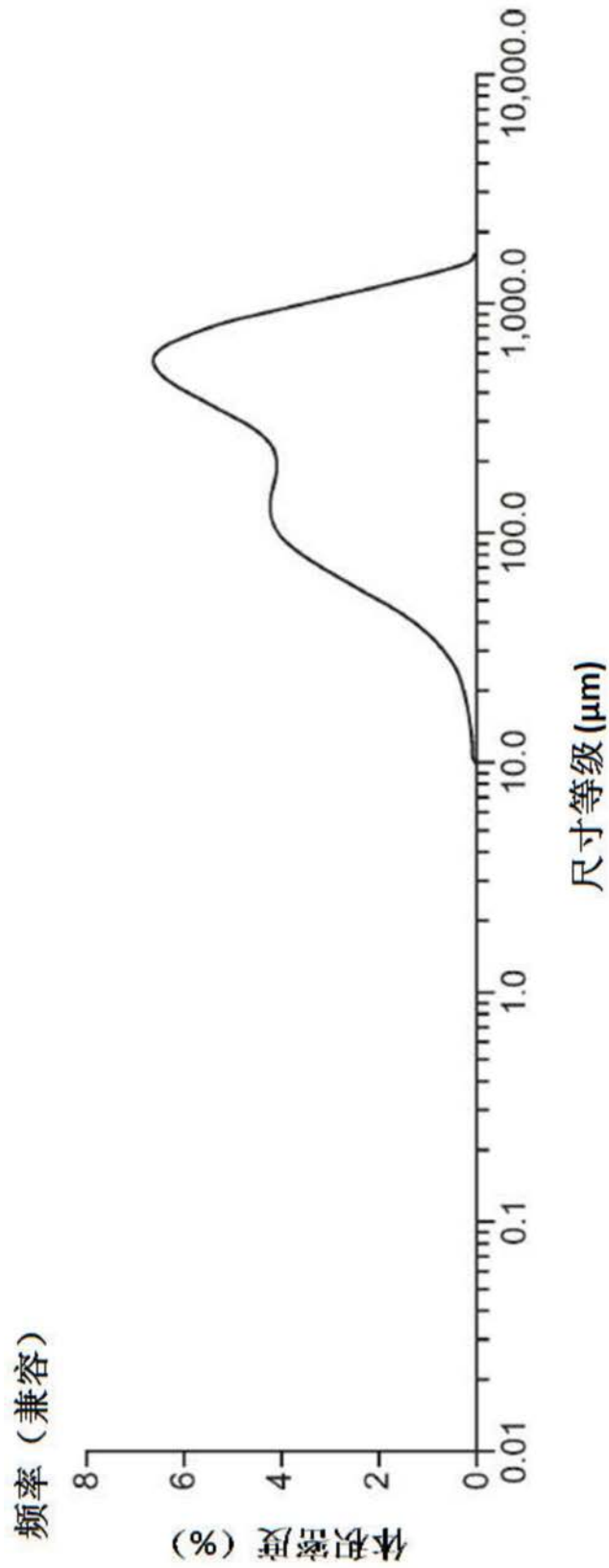


图28

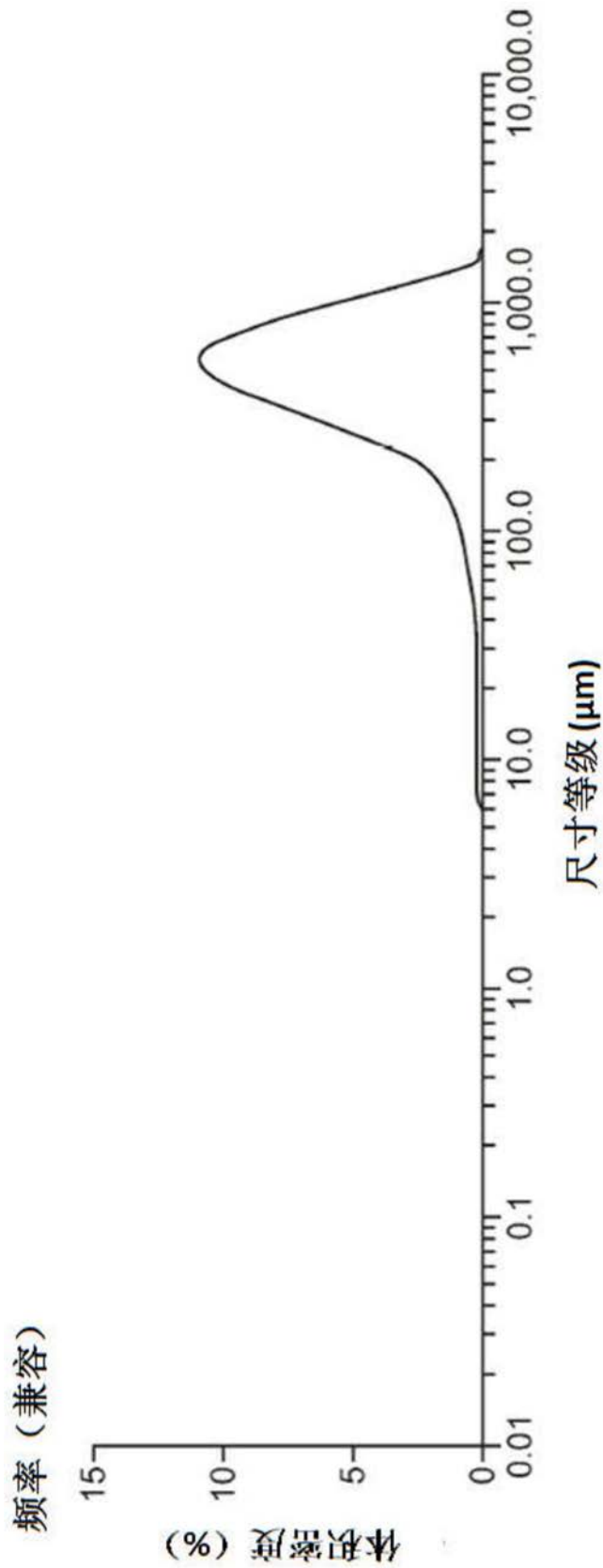


图29

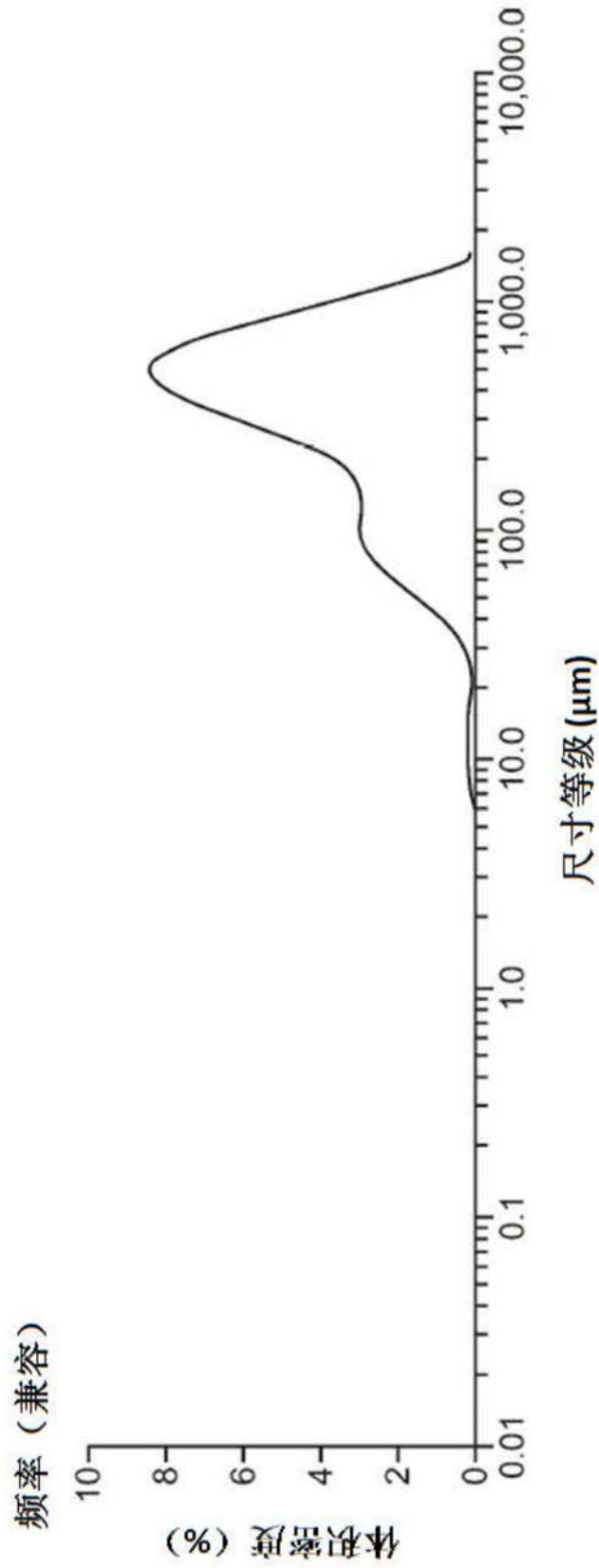


图30

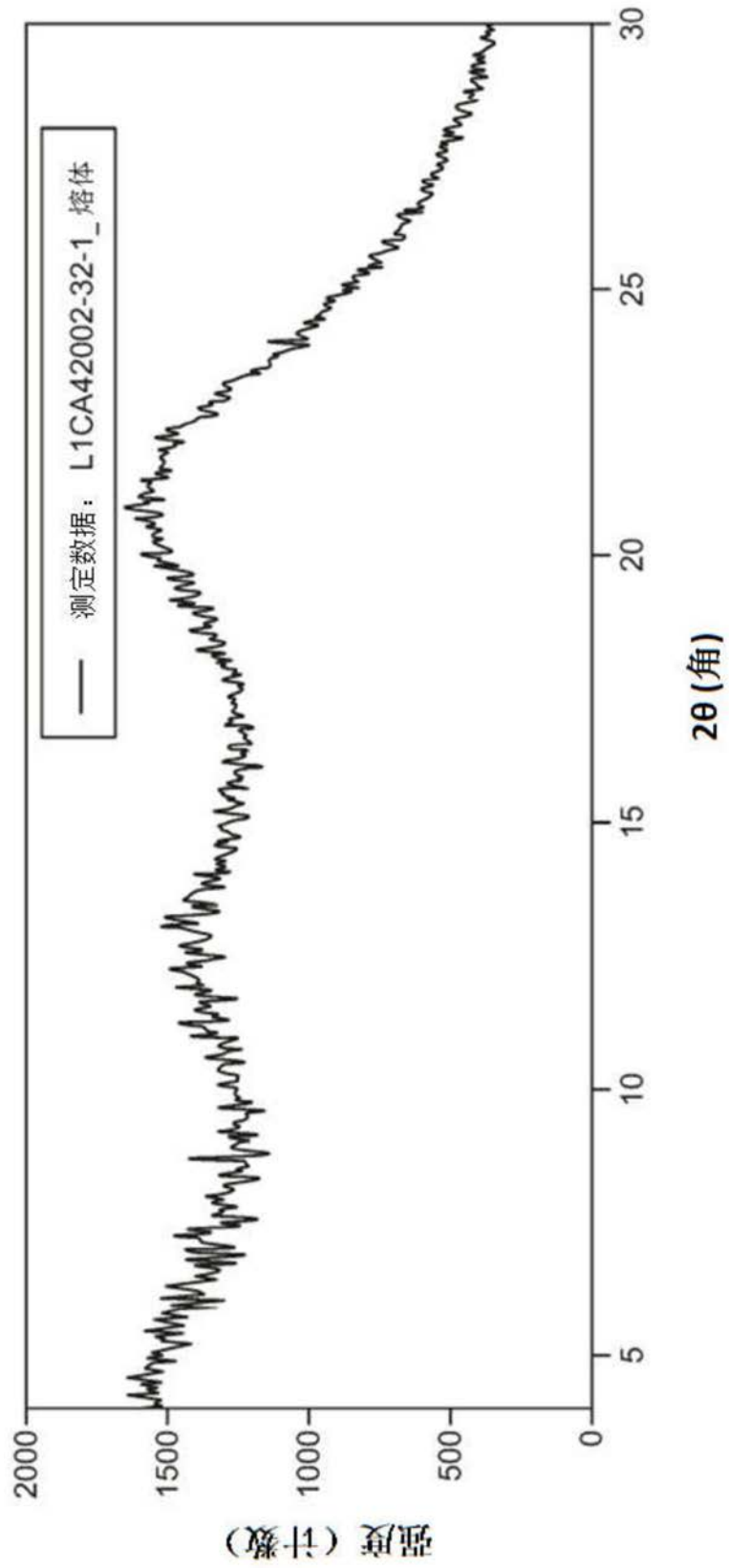


图31

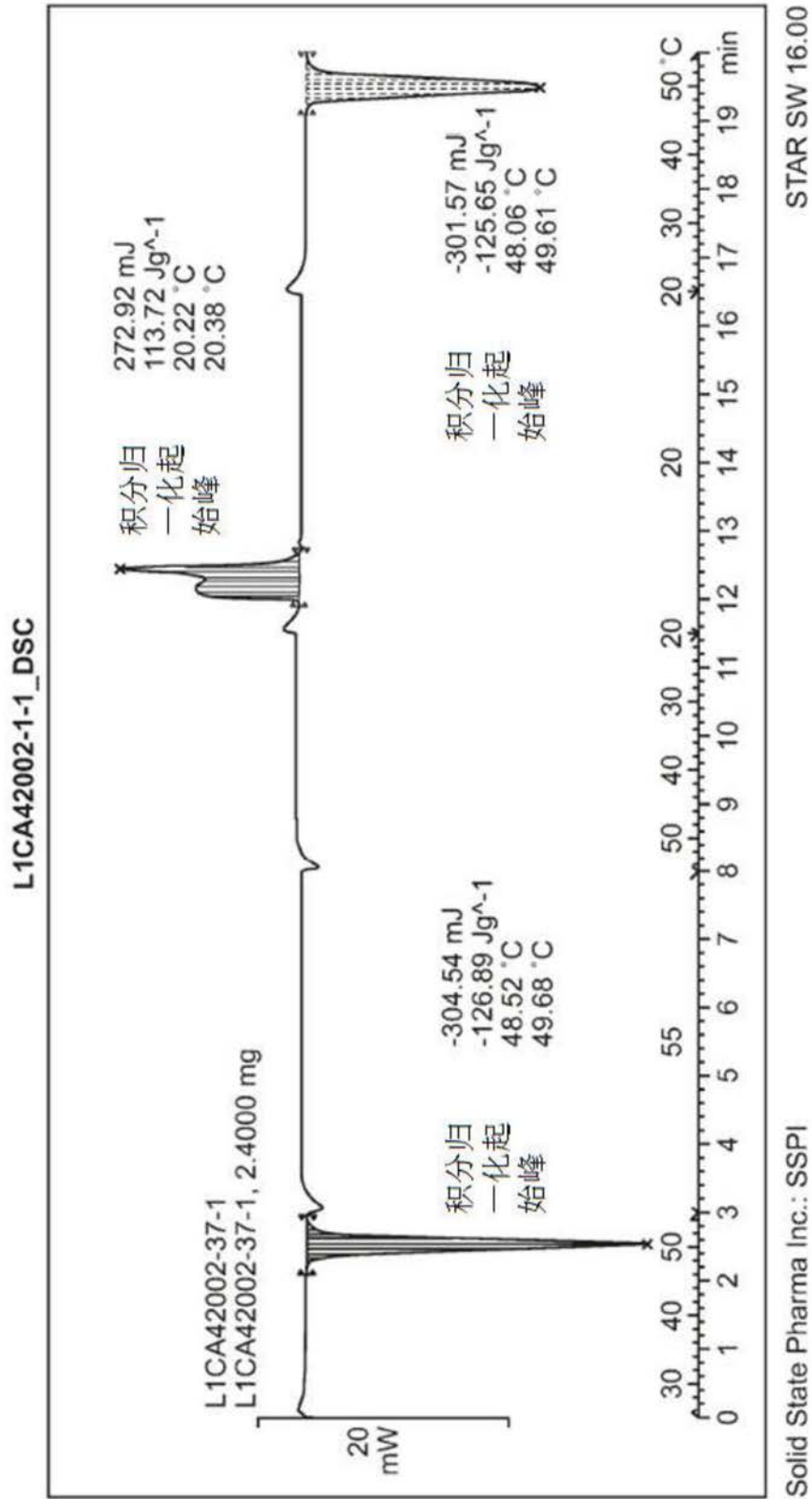


图32