



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I586663 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：099140523

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 11 月 24 日

(51)Int. Cl. : C07D405/06 (2006.01)

C07D405/10 (2006.01)

A61K31/357 (2006.01)

A61K31/4025 (2006.01)

(30)優先權：2009/11/27 美國

61/264,748

(71)申請人：簡詹姆公司(美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：劉 漢蘭 LIU, HANLAN (US)；威立斯 克里斯 WILLIS, CHRIS (US)；巴得瓦
瑞娜 BHARDWAJ, RENA (US)；克皮蘭 黛安 P COPELAND, DIANE P. (US)；
哈里安那瓦拉 阿必策 HARIANAWALA, ABIZER (US)；史凱爾 傑佛瑞 SKELL,
JEFFREY (US)；馬歇爾 約翰 MARSHALL, JOHN (GB)；柯西林 吉安麥
KOCHLING, JIANMEI (US)；派樂司 吉拉爾得 PALACE, GERARD (US)；彼得
史密特 萊蒂絲 PETERSCHMITT, JUDITH (US)；席格 克雷格 SIEGEL, CRAIG
(US)；鄭 森 CHENG, SENG (US)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

MCEACHERN, KERRY ANNE ET AL: "A specific and potent inhibitor of
glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of
Gaucher disease", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, vol. 91, no.
3, pages 259-267, (2007-05-16)

" Substance Name: Eliglustat tartrate [USAN]", 網址: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/928659-70-5>.

審查人員：簡正芳

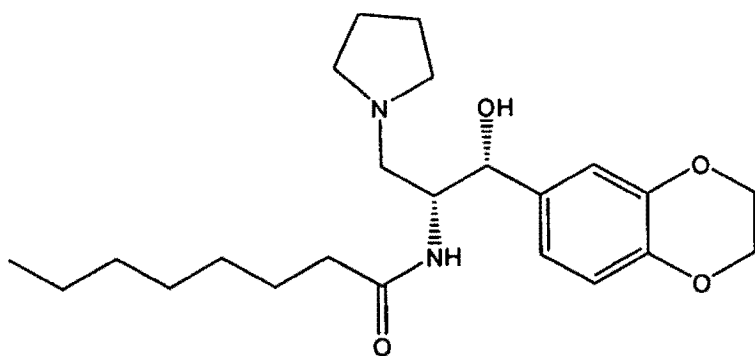
申請專利範圍項數：52 項 圖式數：15 共 101 頁

(54)名稱

作為葡萄糖神經醯胺合成酶抑制劑的 GENZ 112638 半酒石酸鹽之非結晶形與結晶形式
AN AMORPHOUS AND A CRYSTALLINE FORM OF GENZ 112638 HEMITARTRATE AS
INHIBITOR OF GLUCOSYLCERAMIDE SYNTHASE

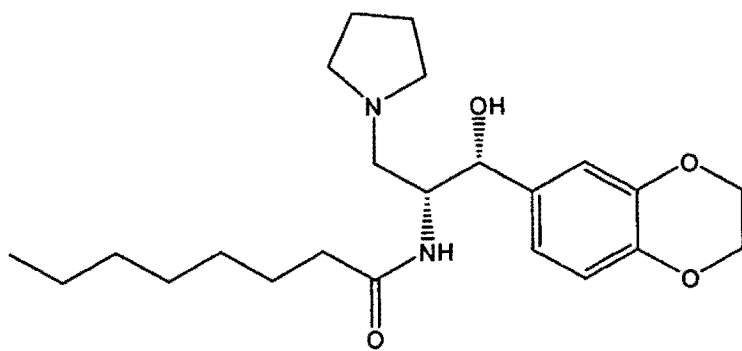
(57)摘要

揭露由下述結構分子式所表示的化合物的半酒石酸鹽：



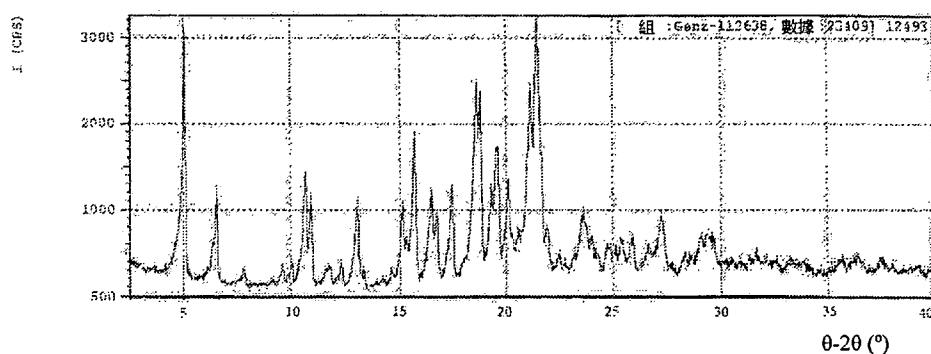
(分子式 I 半酒石酸鹽)，其可用於藥學應用。該分子式(I)半酒石酸鹽之特定單一結晶形式的特徵在於各種特性以及物理測量。同時，也討論了製造結晶分子式(I)半酒石酸鹽，以及使用它以抑制個體中葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醣神經鞘脂濃度，以治療許多疾病的方法。也描述了藥學組成物。

The hemitartrate salt of a compound represented by the following structural formula:



(Formula I Hemitartrate), which may be used in pharmaceutical applications, are disclosed. Particular single crystalline forms of the Formula (I) Hemitartrate are characterized by a variety of properties and physical measurements. As well, methods of producing crystalline Formula (I) Hemitartrate, and using it to inhibit glucosylceramide synthase or lowering glycosphingolipid concentrations in subjects to treat a number of diseases, are also discussed. Pharmaceutical compositions are also described.

指定代表圖：

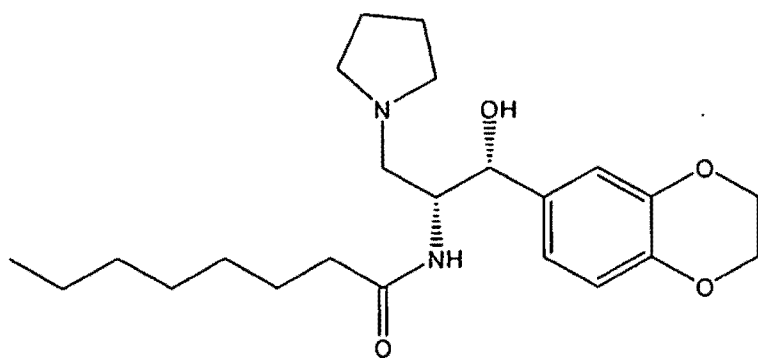


第 1 圖

特徵化學式：

I586663

TW I586663 B



修正
105年9月14日
補充

公告本

105年9月14日替換頁

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：9914 0523

C07D 405/06, 405/10,

※申請日：99.11.24

※IPC 分類：

A61K 31/357, 31/405

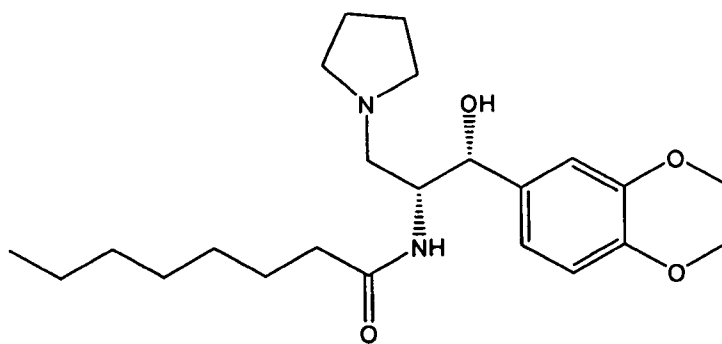
一、發明名稱：(中文/英文)

作為葡萄糖神經醯胺合成酶抑制劑的 GENZ 112638 半酒石酸鹽之非結晶形與結晶形式

AN AMORPHOUS AND A CRYSTALLINE FORM OF
GENZ 112638 HEMITARTRATE AS INHIBITOR OF
GLUCOSYLCERAMIDE SYNTHASE

二、中文發明摘要：

揭露由下述結構分子式所表示的化合物的半酒石酸鹽：

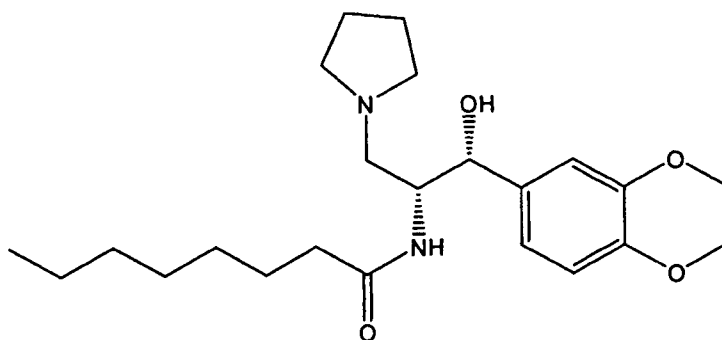


(分子式 I 半酒石酸鹽)，其可用於藥學應用。該分子式(I)半酒石酸鹽之特定單一結晶形式的特徵在於各種特性以及物理測量。同時，也討論了製造結晶分子式(I)半酒石酸鹽，以及使用它以抑制個體中葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醣神經鞘脂濃度，以治療許多疾病的方法。也描述了藥學組成物。

105 年 9 月 14 日 修正
補充

三、英文發明摘要：

The hemitartrate salt of a compound represented by the following structural formula:



(Formula I Hemitartrate), which may be used in pharmaceutical applications, are disclosed. Particular single crystalline forms of the Formula (I) Hemitartrate are characterized by a variety of properties and physical measurements. As well, methods of producing crystalline Formula (I) Hemitartrate, and using it to inhibit glucosylceramide synthase or lowering glycosphingolipid concentrations in subjects to treat a number of diseases, are also discussed. Pharmaceutical compositions are also described.

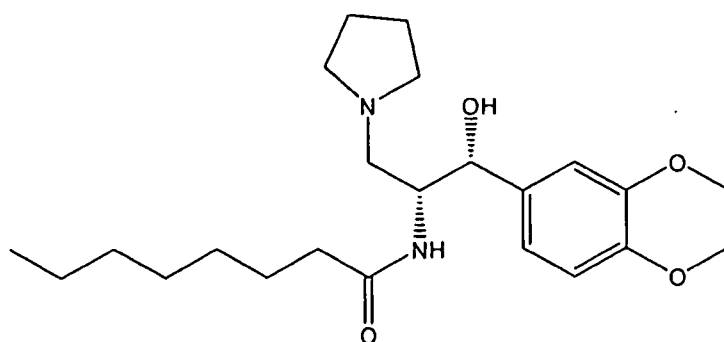
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

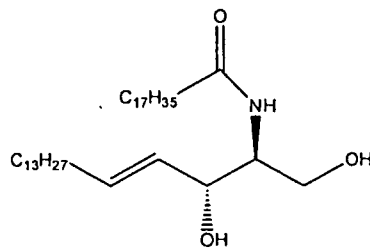
100年2月25日修正
補充

【發明所屬之技術領域】

本案係關於特定化合物之半酒石酸鹽、製造其結晶的方法、包含其的藥學組成物、以及其於治療疾病的用途。

【先前技術】

醣神經鞘脂 (GSL) 是一種天然存在的化合物，其具有許多生物功能，包括促進細胞生長、細胞分化、細胞之間附著或細胞與基質蛋白質之間附著、微生物與病毒結合至細胞、以及腫瘤細胞轉移的能力。GSL 源自葡萄糖神經醯胺 (GlcCer)，其經由酵素 UDP-葡萄糖：N-醯基神經鞘氨醇葡萄糖基轉移酶 (GlcCer 合成酶) 而從腦醯胺以及 UDP-葡萄糖產生。腦醯胺的結構如下所示：



腦醯胺

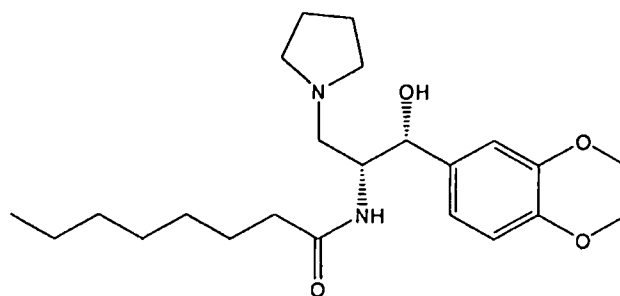
GSL 的累積已被連結至許多疾病，包括戴薩克斯症 (Tay-Sachs)、高雪氏症 (Gaucher) 以及法布瑞氏症 (Fabry) (見，例如，美國專利編號第 6,051,598 號)。GSL 也已被連結至特定的癌症。例如，已發現某些 GSL 只發生在腫瘤中或在腫瘤中有異常高的濃度；當加至在培養基中的腫瘤細胞時，造成對腫瘤生長顯著的刺激或抑制作用；以及當被腫瘤散佈至周圍的細胞外液中時，抑制了身體的正常免

100年2月修正
補充

100年2月25日修正替換頁

疫對抗系統。當腫瘤變得越來越惡性時，腫瘤之 GSL 的組成改變，且對於某些 GSL 的抗體抑制了腫瘤的生長。

抑制 GlcCer 合成酶的化合物可降低 GSL 濃度，且已被報導有用於治療具有其中一種前述疾病的個體。在美國專利編號第 6,051,598、5,952,370、5,945,442、5,916,911 以及 6,030,995 號中揭露了許多有效的 GlcCer 抑制劑，在本文中被提及為「似胺基腦醯胺化合物」。如下所示，分子式(I)的化合物是目前在臨床試驗中用以治療高雪氏症的 GlcCer 合成酶抑制劑：



(I).

有此候選藥物之鹽類形式的需要，該候選藥物為結晶，且另外具有可修改而用於大量製造的物理特性。也有藥學配方的需要，在該藥學配方中，此候選藥物是穩定的，且有效地被運送至該病患，以及也有使用此化合物而改進治療方法的需要。

【發明內容】

已發現該分子式(I)化合物的半酒石酸鹽(以下稱為「分子式(I)半酒石酸鹽」)可在清楚定義的環境下結晶，以提供特定的非吸濕性結晶形式。當相較於分子式(I)的其他鹽類時，分子式(I)半酒石酸鹽具有數個有利的特性。如同範

修正
補充
100年2月25日

100年2月25日修正替換頁

例 1 中進一步描述的，許多分子式(I)鹽類，包括檸檬酸鹽、蘋果酸鹽、富馬酸、甲基磺酸以及醋酸，不能以固體形式獲得。雖然該氫氯酸以及 1:1 的分子式(I)酒石酸鹽以固體形式獲得，兩者皆非結晶，且兩者對於配方來說均太具吸濕性。分子式(I)半酒石酸鹽比該游離鹼以及其他的鹽類容易配製以及合成。分子式(I)半酒石酸鹽也為結晶、具非吸濕性、水溶性，且比相對應的游離鹼（於此稱為「分子式(I)游離鹼」）以及其他鹽類流動性佳。因此，這些有利的特性使分子式(I)半酒石酸鹽為可修改的以用於大量製造而做為候選藥物。

也已發現用於分子式(I)半酒石酸鹽膠囊配方的穩定顆粒可使用非水溶性填充料、水溶性填充料以及分子式(I)半酒石酸鹽以已定義的比例而製備。基於此發現，揭露了穩定的分子式(I)半酒石酸鹽藥學配方。

也已發現該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）由肝臟代謝，主要藉由細胞色素 P450 酵素代謝。基於此發現，揭露了利用該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）的治療方法，其減少了藥物/藥物交互作用的可能性。

也已發現，相較於單獨以葡萄糖腦苷脂酶治療或單獨以分子式(I)半酒石酸鹽治療，被給予重組葡萄糖腦苷脂酶、然後給予分子式(I)半酒石酸鹽的高雪氏小鼠在內臟器官中顯示了較低量的 GL1，以及在肝臟中顯示了減低數量的高雪氏細胞。基於此發現，也揭露了使用該分子式(I)化

合物或其藥學上可接受的鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）的合併療法。

本申請案的一個具體實施例是以分子式(I)表示之化合物的半酒石酸鹽。如上所提及的，由分子式(I)所表示之該化合物的半酒石酸鹽在本文中以「分子式(I)半酒石酸鹽」提及。由分子式(I)所表示之該化合物在本文中以「分子式(I)游離鹼」提及。

本申請案的另一個具體實施例提供了包含藥學可接受的載體或稀釋劑以及分子式(I)半酒石酸鹽的藥學組成物。

另一個具體實施例提供了藉由將有效量的分子式(I)半酒石酸鹽給藥至需要其的個體而抑制該個體中葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醣神經鞘脂濃度的方法。

另一個具體實施例提供了分子式(I)半酒石酸鹽的用途，用以製造用於在需要其的個體中抑制葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醣神經鞘脂濃度的藥劑。

另一個具體實施例提供了分子式(I)半酒石酸鹽的用途，用以在需要其的個體中抑制葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醣神經鞘脂濃度。

另一個具體實施例是治療具有高雪氏症之個體的方法。該方法包含將有效量的第一醫療劑與有效量的第二醫療劑結合而給藥至該個體。該第一醫療劑是由分子式(I)所表示或為其藥學上可接受的鹽類；以及該第二醫療劑對高雪氏症的治療有效。

另一個具體實施例是治療具有法布瑞氏症之個體的方法。

法。該方法包含將有效量的第一醫療劑與有效量的第二醫療劑結合而給藥至該個體。該第一醫療劑是由分子式(I)所表示或為其藥學上可接受的鹽類；以及該第二醫療劑對法布瑞氏症的治療有效。

另一個具體實施例提供了藥學組成物，其包含：由分子式(I)所表示之化合物的半酒石酸鹽；至少一水溶性填充料；至少一非水溶性填充料；至少一黏結劑；以及至少一潤滑劑。

本發明的另一個具體實施例是治療具有法布瑞氏症之個體的方法。該方法包含下列步驟：

a)將有效量的分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類給藥至該個體；

b)測試該個體，以決定該個體是否為差的、中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者；

c)如果該個體是中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者，決定該化合物的已調整之有效量；以及

d)如果該個體是中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者，將已調整之有效量的該分子式(I)化合物給藥至該個體，以及如果該個體是差的 P450 代謝者，將有效量的該分子式(I)化合物給藥至該個體。

本發明的另一個具體實施例是治療具有高雪氏症之個體的方法。該方法包含下列步驟：

a)將有效量的分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類給藥至該個體；

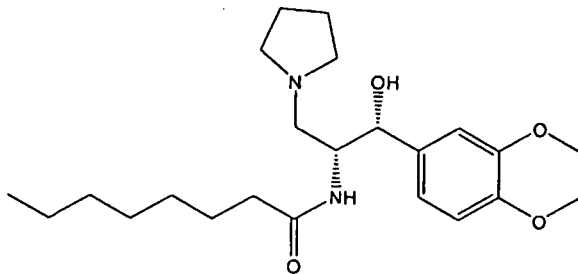
b)測試該個體，以決定該個體是否為差的、中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者；

c)如果該個體是中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者，決定該化合物的已調整之有效量；以及

d)如果該個體是中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者，將已調整之有效量的該分子式(I)化合物給藥至該個體；以及如果該個體是差的 P450 代謝者，將有效量的該分子式(I)化合物給藥至該個體。

本發明的另一個具體實施例是治療具有法布瑞氏症之個體的方法。該方法包含下列步驟：

a)將有效量之由下述結構分子式所表示的化合物：



；或其藥學上可接受的鹽類
給藥至該個體；

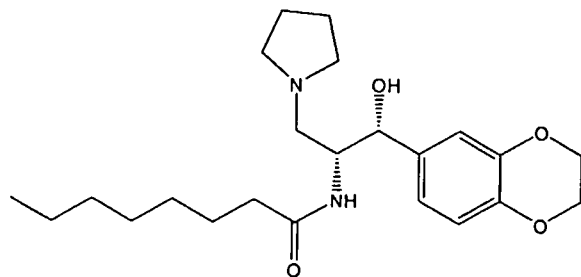
b)評估該個體中該化合物的波谷血漿量；以及

c)調整給藥至該個體的化合物量，使得該化合物的該波谷血漿量為至少 5 ng/ml。或者，在步驟 b)中評估該個體中該化合物的該波谷血漿量以及 C_{max} ，以及在步驟 c)中調整給藥至該個體的化合物量，使得該個體中該化合物的波谷血漿量為至少 5 ng/ml，以及使該個體中該化合物的該 C_{max} 低於 100 ng/ml。

本發明的另一個具體實施例是治療具有高雪氏症之個

體的方法。該方法包含下列步驟：

a)將有效量之由下述結構分子式所表示的化合物：



；或其藥學上可接受的鹽類

給藥至該個體；

b)評估該個體中該化合物的波谷血漿量；以及

c)調整給藥至該個體的化合物量，使得該個體中該化合物的該波谷血漿量為至少 5 ng/ml。或者，在步驟 b)中評估該個體中該化合物的該波谷血漿量以及 C_{max} ，以及在步驟 c)中調整給藥至該個體的化合物量，使得該個體中該化合物的波谷血漿量為至少 5 ng/ml，以及使該個體中該化合物的該 C_{max} 低於 100 ng/ml。

【實施方式】

本申請案提供了獨特的分子式(I)半酒石酸鹽結晶形式以及新的分子式(I)半酒石酸鹽之藥學組成物，其包含本文中所描述之分子式(I)半酒石酸鹽的結晶形式。本申請案也提供了在需要其的個體中抑制葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醯神經鞘脂濃度的方法。另外，本申請案提供了製備特定分子式(I)半酒石酸鹽結晶形式的方法。本申請案也提供了分子式(I)半酒石酸鹽的穩定藥學配方、使用該分子式(I)化合物或其藥學上可接受鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）

的合併療法，以及以該分子式(I)化合物或其藥學可接受鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）治療的方法，該分子式(I)化合物或其藥學可接受鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）最小化了藥物/藥物交互作用的風險。

分子式(I)半酒石酸鹽的結晶形式

在特定的具體實施例中，至少一特定重量百分比的分子式(I)半酒石酸鹽是結晶。特定的重量百分比包括 70%、72%、75%、77%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或介於 70%以及 100%之間的百分比。

在另一個特定的具體實施例中，至少一特定重量百分比的分子式(I)半酒石酸鹽是分子式(I)半酒石酸鹽的單一結晶形式。特定的重量百分比包括 70%、72%、75%、77%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或介於 70%以及 100%之間的百分比。

如同本文中所使用的，「結晶」意指具有晶體結構的固體，其中該個別分子具有高度同質規律的鎖入化學構形。結晶分子式(I)半酒石酸鹽可為分子式(I)半酒石酸鹽之單一結晶形式的晶體，或不同單一結晶形式之晶體的混合物。單一結晶形式意指分子式(I)半酒石酸鹽為單一晶體或其中每個晶體具有相同晶體形式的多個晶體。

當特定重量百分比的分子式(I)半酒石酸鹽是單一結晶

形式時，剩餘的分子式(I)半酒石酸鹽是非結晶形分子式(I)半酒石酸鹽的某種組合，及/或除了該單一結晶形式之外的一或更多其他分子式(I)半酒石酸鹽的結晶形式。當該結晶分子式(I)半酒石酸鹽被定義為分子式(I)半酒石酸鹽的一個特定結晶形式的具體百分比時，剩餘的是由非結晶形式及/或被具體指出之該一或更多特定形式之外的結晶形式組成。單一結晶形式的範例包括分子式(I)半酒石酸鹽的形式A，其特徵在於如同本文中所討論的一或更多個特性。

因為酒石酸具有兩個羧酸基團，其可形成具有不同的由分子式(I)所表示之化合物對酒石酸鹽（酒石酸的共軛鹼）之莫耳比的鹽類。例如，其中酒石酸鹽對分子式(I)的莫耳比約為一比一的鹽類是分子式(I)酒石酸鹽（1 酒石酸鹽：1 分子式(I)）；以及其中酒石酸鹽對分子式(I)的莫耳比約為一比二的鹽類是分子式(I)半酒石酸鹽（1 酒石酸鹽：2 分子式(I)）。

該半酒石酸鹽可以各種立體異構物形式存在。立體異構物是只有在它們的空間排列上不同的化合物。鏡像異構物是立體異構物對，它們的鏡像不可疊合，通常因為它們包含不對稱取代的碳原子，該碳原子作為對掌性中心。非鏡像異構物是非鏡像關係的立體異構物，通常因為它們包含二或更多的非對稱取代碳原子。

當該立體化學被命名（例如，如同在 L-(+)-酒石酸中）或藉由結構描繪（例如，如同在分子式(I)中）時，所命名或描繪的立體異構物相對於其他的立體異構物是至少

60%、70%、80%、90%、99%或 99.9%的重量純度。當單一鏡像異構物被命名（例如，如同在 L-(+)-酒石酸中）或藉由結構描繪（例如，如同在分子式(I)中）時，所描繪或命名的鏡像異構物是至少 80%、90%、99%或 99.9%的重量光學純度。光學純度重量百分比是該鏡像異構物重量比上該鏡像異構物重量加上其光學異構物重量的比例。

「消旋物」或「消旋混合物」意指等莫耳量之兩種鏡像異構物的化合物，其中這種混合物不展現光學性；即，它們不旋轉偏極光的平面。

酒石酸具有三種立體異構物：L-(+)-酒石酸或右旋酒石酸以及其鏡像異構物、左旋酒石酸或 D-(-)-酒石酸、以及該非對掌形式，內消旋酒石酸。該 L 或 D 命名不表示該酸旋轉偏極光平面的能力。

可使用酒石酸的任何立體異構物以製備分子式(I)半酒石酸鹽。例如，可只從其立體異構物的其中一個，或從它們的組合形成該半酒石酸鹽。該半酒石酸鹽選自 D-半酒石酸鹽、L-半酒石酸鹽、半內消旋酒石酸或外消旋的 D、L-半酒石酸鹽。在特定的具體實施例中，該半酒石酸鹽是 L-半酒石酸鹽。「L-半酒石酸鹽」意指該半酒石酸鹽是從 L-酒石酸形成。外消旋的 D、L-半酒石酸鹽意指 D-酒石酸鹽以及 L-酒石酸鹽兩者均被使用於分子式(I)半酒石酸鹽的製備中。在外消旋 D、L-半酒石酸鹽中的 D-酒石酸鹽量可大於、等於或小於所存在的 L-酒石酸鹽量。

「左旋」意指當偏極光穿過非對稱的化合物時被旋轉

至左邊。用以意指左旋的字首是「L」。

「右旋」意指當偏極光穿過非對稱的化合物時被旋轉至右邊。用以意指右旋的字首是「D」。

分子式(I)半酒石酸鹽的製備

可藉由在適合的溶劑中混合分子式(I)與 L-酒石酸而製備出分子式(I)半酒石酸鹽。可藉由加入種晶而幫助分子式(I)半酒石酸鹽的沉澱。可使用的溶劑為甲醇、水、乙醇、丙酮、醋酸乙酯或其組合。

舉例來說，可藉由緩慢的蒸發作用、緩慢的冷卻以及抗溶劑沉澱而製備出分子式(I)半酒石酸鹽的特定固體形式。在這些方法中可使用的溶劑包括水、庚烷、己烷、甲苯、二氯甲烷、乙醇、異丙醇、乙腈、醋酸乙酯、甲醇、丙酮、甲基叔丁基醚（在本文中被提及為「TBME」）、p-二噁烷以及四氫呋喃（在本文中被提及為「THF」）。

可藉由從在溶劑或溶劑混合物中的分子式(I)半酒石酸鹽溶液中將溶劑蒸發，而製備出分子式(I)半酒石酸鹽固體形式。適合的溶劑混合物包括甲醇、乙醇、丙酮、水、醋酸乙酯以及二氯甲烷。較佳的溶劑混合物包括乙醇、甲醇、水以及丙酮。

可經由緩慢冷卻在溶劑中之分子式(I)半酒石酸鹽加熱溶液而製備分子式(I)半酒石酸鹽固體形式。適合的溶劑包括乙醇、甲醇、水、丙酮以及醋酸乙酯。

藉由將溶劑中之分子式(I)半酒石酸鹽加熱溶液放置在

冷卻浴中，可經由快速冷卻該溶液而製備分子式(I)半酒石酸鹽固體形式。適合的溶劑包括乙醇、甲醇、丙酮、水、醋酸乙酯或這些溶劑的混合物。

可藉由在給定溫度下將在上述溶劑中之分子式(I)半酒石酸鹽溶液加至抗溶劑中，而製備出分子式(I)半酒石酸鹽固體形式。更特別的是，該抗溶劑是醋酸乙酯、丙酮、乙腈、甲苯、THF、TBME、p-二噁烷、異丙醇或庚烷。特定的溶劑/抗溶劑混合物包括甲醇/醋酸乙酯、甲醇/丙酮、甲醇/己烷、甲醇/庚烷、甲醇/乙腈、甲醇/甲苯、甲醇/THF、甲醇/TBME、甲醇/p-二噁烷、乙醇/醋酸乙酯、乙醇/己烷、乙醇/庚烷、乙醇、丙酮、乙醇/乙腈、乙醇/甲苯、乙醇/TBME、乙醇/THF、水/THF、水/異丙醇、水/乙腈、水/丙酮、二氯甲烷/庚烷、二氯甲烷/丙酮、二氯甲烷/醋酸乙酯、二氯甲烷/乙腈、二氯甲烷/甲苯、二氯甲烷/THF、二氯甲烷/TBME、二氯甲烷/p-二噁烷，以及二氯甲烷/異丙醇。

較佳的溶劑/抗溶劑混合物包括甲醇/醋酸乙酯、甲醇/丙酮、甲醇/TBME 以及水/丙酮。

如同本文中所使用的，「抗溶劑」意指一種溶劑，在該溶劑中，分子式(I)半酒石酸鹽具有低溶解度，並導致該半酒石酸鹽以細緻粉末或晶體的形式而從溶液沉澱出。

產生分子式(I)半酒石酸鹽之固體形式的額外方法包括將該固體從醋酸乙酯/丙酮沉澱出，並隨選地乾燥在室溫下形成的固體。在另一個方法中，該固體接著可從丙酮被再結晶，可加入或不加入種晶。或者，可從醋酸乙酯/丙酮溶

劑沉澱出分子式(I)半酒石酸鹽，並從醋酸乙酯再結晶。或者，分子式(I)半酒石酸鹽然後可從異丙醇中再結晶。或者，可只使用丙酮而無進一步的再結晶作用而製備出分子式(I)半酒石酸鹽。或者，可在短暫的回流之後，不經進一步的再結晶作用，而從丙酮沉澱出分子式(I)半酒石酸鹽。

或者，隨後可從甲醇/丙酮中再結晶出分子式(I)半酒石酸鹽，可加或不加種晶。或者，隨後可從水/丙酮中再結晶出分子式(I)半酒石酸鹽，可加或不加種晶。

分子式(I)半酒石酸鹽之結晶形式的特徵描述

在特定的具體實施例中，分子式(I)半酒石酸鹽的結晶形式，晶體形式 A，其特徵在於在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° ，以及 21.7° 之 2θ 角的一、二、三、四或五個主要的 XRPD 峰。在一個更特定的具體實施例中，該結晶形式的特徵在於在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 13.3° 、 15.1° 、 15.9° 、 16.5° 、 17.6° 、 18.6° 、 18.7° 、 19.0° 、 20.2° 、 21.7° 以及 23.5° 之 2θ 角的 XRPD 峰。要了解的是，特定的 2θ 角意指該特定值 $\pm 0.2^\circ$ 。

如同本文中所使用的，「主要的 XRPD 峰」意指具有相對強度大於 25% 的 XRPD 峰。相對強度被計算為目標峰之峰強度對上最大峰之峰強度的比例。

使用分子式(I)半酒石酸鹽治療的方法

如同本文中所使用的，個體是哺乳動物，較佳為人類

病患，但也可為需要獸醫治療的動物，例如伴侶動物（例如，狗、貓，以及諸如此類）、農場動物（例如，牛、綿羊、豬、馬，以及諸如此類）或實驗室動物（例如，大鼠、小鼠、天竺鼠，以及諸如此類）。可替換地使用個體以及病患。

本申請案的一個具體實施例是藉由將有效量的分子式 (I) 半酒石酸鹽，包括其結晶形式（如上所描述），給藥至需要其的個體，而減慢，例如，抑制或減少該個體中葡萄糖神經醯胺合成酶活性或降低醣神經鞘脂濃度的方法。

需要治療的個體是具有症狀或疾病的個體，該個體從抑制細胞中（特別是溶小體或細胞膜）的葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醣神經鞘脂濃度而得到益處。已顯示葡萄糖神經醯胺合成酶的抑制劑有用於治療溶小體儲存的疾病，例如戴薩克斯症、高雪氏症或法布瑞氏症（見，例如，美國專利編號第 6,569,889；6,255,336；5,916,911；5,302,609；6,660,749；6,610,703；5,472,969；5,525,616 號，其全部的教導在本文中併入以做為參考）。

症狀或疾病的範例包括多囊性腎臟疾病以及膜狀腎絲球腎病（見美國臨時專利申請案 61/130,401 以及 61/102,541，其全部的教示在本文中併入以做為參考）、腎絲球腎炎以及腎絲球硬化症（見美國臨時專利申請案 61/137,214）、狼瘡（見 PCT/US2009/001773，其全部的教示在本文中併入以做為參考）、糖尿病，包括第 2 型糖尿病（見 WO 2006/053043，其全部的教示在本文中併入以做

為參考)；治療牽涉細胞生長以及分裂的失調，包括癌症、膠原血管病、動脈硬化以及糖尿病病患的腎臟肥大(見美國專利編號第 6,916,802 以及 5,849,326 號，其全部的教示在本文中併入以做為參考)；抑制動脈上皮細胞的生長(見美國專利編號第 6,916,802 以及 5,849,326)；治療遭受感染的病患(見 Svensson, M. et al., "Epithelial Glucosphingolipid Expression as a Determinant of Bacterial Adherence and Cytokine Production," *Infect. and Immun.*, 62:4404-4410 (1994)，其全部的教示在本文中併入以做為參考)；阻止該宿主，即，病患，產生對抗該腫瘤的抗體(見 Inokuchi, J. et al., "Antitumor Activity in Mice of an Inhibitor of Glycosphingolipid Biosynthesis," *Cancer Lett.*, 38:23-30(1987)，其全部的教示在本文中併入以做為參考)；以及治療腫瘤(見 Hakomori, S. "New Directions in Cancer Therapy Based on Aberrant Expression of Glycosphingolipids: Anti-adhesion and Ortho-Signaling Therapy," *Cancer Cells* 3:461-470 (1991), Inokuchi, J. et al., "Inhibition of Experimental Metastasis of Murine Lewis Long Carcinoma by an Inhibitor of Glycosylceramide Synthase and its Possible Mechanism of Action," *Cancer Res.*, 50:6731-6737 (1990)以及 Ziche, M. et al., "Angiogenesis Can Be Stimulated or Repressed in In Vivo by a Change in GM3 :GD3 Ganglioside Ratio," *Lab. Invest.*, 67:711-715 (1992)，其全部的教示在本文中併入以做為參考)。

分子式(I)半酒石酸鹽也可使用於類癌症疫苗的製備(見,例如,美國專利編號第 6,569,889; 6,255,336; 5,916,911; 5,302,609; 6,660,749; 6,610,703; 5,472,969; 5,525,616 號)。

該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類(包括其半酒石酸鹽)可使用於所揭露之做為單一療法的方法,即,做為唯一的藥學活性成分而被給藥,以治療該徵兆。

或者,該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類(包括該其半酒石酸鹽)可使用於所揭露之做為與其他本技術領域已知醫療活性藥物的合併療法,用以治療所要的疾病或徵兆。「協同療法」或「組合」或「合併療法」或「共同給藥」在本文中可替換地使用,且意指該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類(包括該半酒石酸鹽)是在一或更多的其他醫療劑之前、之後或同時給藥。在一個具體實施例中,合併療法用以治療溶小體疾病,例如高雪氏症或法布瑞氏症。或者,該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類(包括該半酒石酸鹽)可做為分配的配分或合併的配方而同時共同給藥(例如,同時地)。或者,當經由熟練的臨床醫師決定,在適當的時間框架內,該試劑可做為分開的組成物而相繼地給藥(例如,足以允許該療法之藥學效果重疊的時間)。該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類(包括該半酒石酸鹽)以及一或更多的其他醫療劑可在單一劑量或多重劑量中以次序並在適合達到所想要之醫療效果的時程表上給藥。

有效於高雪氏症治療的醫療劑包括葡萄糖腦苷脂酶、葡萄糖腦苷脂酶的類似物、葡萄糖神經醯胺合成酶的抑制劑以及結合至葡萄糖腦苷脂酶並恢復其正確構形的分子伴護蛋白。葡萄糖腦苷脂酶或其類似物可源自人類或哺乳動物。或者，葡萄糖腦苷脂酶以及其類似物可重組地獲得。葡萄糖腦苷脂酶的類似物包括該酵素的截斷形式及/或相對於該天然酵素之天然胺基序列而具胺基酸取代的酵素，前提是該生物活性被保留。葡萄糖腦苷脂酶類似物的範例包括伊米苷酶（由 Genzyme 股份有限公司以商標名稱 Cerezyme® 販售）、Taliglucerase Alfa（由 Protalix Biotherapeutics 股份有限公司研發並以商標名稱 Uplyso® 銷售）以及 Velaglucerase Alfa（由 Shire PLC 研發），其為重組 DNA 產生的人類 β -葡萄糖腦苷脂酶之類似物。分子伴護蛋白的範例包括 Isofagomine（由 Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ 在商標名稱 Plicera™ 下研發）。Isofagomine 也已知為 afegostat tartrate，並包含 Isofagomine 的酒石酸鹽形式做為其活性成分。葡萄糖腦苷脂酶抑制劑的範例包括美格魯特（由 Actelion Pharmaceuticals Ltd. Allschwil, 瑞士，在 Zavesca™ 的商標名稱下研發）。

有效於治療法布瑞氏症的醫療劑包括 α 半乳糖苷酶 A、 α 半乳糖苷酶 A 的類似物以及結合至 α 半乳糖苷酶 A 並恢復其正確構形的分子伴護蛋白。 α 半乳糖苷酶 A 或其類似物可源自人類或哺乳動物。或者， α 半乳糖苷酶 A 以及其類似物可重組地獲得。 α 半乳糖苷酶 A 的類似物包括

該酵素的截斷形式及/或相對於該天然酵素之天然胺基序列而具胺基酸取代的酵素，前提是該生物活性被保留。 α 半乳糖苷酶 A 類似物的範例包括 Agalsidase beta (為冷凍乾燥藥物而由 Genzyme 股份有限公司以商標名稱法布瑞酶 (Fabrazyme®) 下販售的重組人類 α 半乳糖苷酶) 以及 Agalsidase alfa (由 Shire PLC 以該商標名稱利甫蓋素 (Replagal®) 販售的重組蛋白質)。分子伴護蛋白的範例包括米加司他 (由 Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ 在商標名稱 Amigal™ 下研發，為包含米加司他氫氯化物做為其活性成分的藥物)。

在一個具體實施例中，用於高雪氏或法布瑞氏症治療的合併療法是在兩個階段中執行。在第一階段中，使用有效於治療高雪氏症或法布瑞氏症的藥物 (典型地，用於高雪氏症之葡萄糖腦苷脂酶或其類似物以及用於法布瑞氏症的半乳糖苷酶 A 或其類似物) 以穩定該個體。例如，在高雪氏症 (或法布瑞氏症) 中，使用這些藥物的其中一種以減少該內臟器官中 GL-1 儲存的負擔，例如在肝臟、脾臟、肺臟及/或腎臟中。一旦已完成此舉，於該第二階段中使用該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類 (包括該半酒石酸鹽)，而做為方便的維持療法。該第一階段典型地持續達一、二、三或四週，或達一、二、三、四、六、九或十二個月，或直到該個體的血小板數等於或大於 $100,000 \text{ mm}^3$ ；血紅素濃度等於或大於 11 g/dl (女性) 或 12 g/dl (男性)；及/或該個體的脾臟體積小於或等於正常的 10 倍，且

肝臟體積小於或等於正常的 1.5 倍。一旦使用該分子式 (I) 化合物的療法開始，該第一階段的給藥典型地結束。

如同本文中所使用的，「有效量」意指有效以緩和正被治療之該個體現有症候的量，在該個體中具有最小不可接受的副作用。確切的配方、給藥途徑以及劑量由個別的醫師考慮到病患的症狀而選擇。劑量的量以及間隔可個別地調整，以提供該活性化合物的血漿量足以維持想要的醫療效果。除了該病患的症狀以及該給藥模式之外，給藥的劑量將取決於該病患症候的嚴重程度以及該病患年齡與重量。有效量將典型地導致該化合物的血漿波谷量超過至少 5 ng/ml。如果在有效量的該化合物給藥之後，血漿波谷量低於 5 ng/ml，給藥至那個個體的劑量被改變至「已調整之有效量」，使得該化合物的波谷量為至少 5 ng/ml。或者，如果在有效量的該化合物給藥之後，該化合物的波谷血漿量低於 5 ng/ml，及/或該 $C_{\max}$ 是高於 100 ng/ml，則給藥至該個體的劑量被改變至「已調整之有效量」，使得該化合物的波谷血漿量為至少 5 ng/ml，且該 $C_{\max}$ 是低於 100 ng/ml。有效量的範圍可為每天 0.1 至 500 mg。或者，該有效量範圍為 50-300 mg/天。在另一個替代方案中，該有效量的範圍為 100-300 mg/天。本申請案的該化合物可被持續地給藥，或以特定的時間間隔給藥。例如，本申請案的該化合物可每天給藥 1、2、3 或 4 次，例如，每天一次或每天兩次的配方。可利用商業可得的分析法以決定最理想的劑量範圍及/或給藥的時程表。

在一個具體實施例中，該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類（包括以上所描述的該半酒石酸鹽）的有效量是（無論是做為單一療法或做為協同療法）從 25 毫克至 300 毫克（或者是 25 毫克至 150 毫克；在另一個替代方案中是 50 毫克至 300 毫克；以及在另一個替代方案中是 100 毫克至 300 毫克）的每日劑量，例如每天 25、50、100、200 或 300 毫克。在特定的具體實施例中，有效量的該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）是（無論是做為單一療法或做為協同療法）50 毫克（每天總共 100 毫克）、100 毫克（每天總共 200 毫克）或 150 毫克（每天總共 300 毫克）的每日兩次劑量。在另一個替代性的具體實施例中，該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）的有效量（無論是做為單一療法或做為協同療法）為每日一次的 100 毫克/天、200 毫克/天或 300 毫克/天劑量而給藥。

在另一個具體實施例中，藉由假設該個體是「差的 P450 代謝者」，然後評估波谷血漿量及/或 C_{max} 而決定有效量。如下面所描述，如果該波谷血漿量低於 5 ng/ml；或該化合物的波谷量低於 5 ng/ml 及/或該 C_{max} 是高於 100 ng/ml；或如果決定該個體為中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者，則給藥至該個體的量隨後被改變至已調整之有效量。對於差的 P450 代謝者的有效量（無論是做為單一療法或做為協同療法）通常在每天 100-200 毫克之間，例如 100 或 200 毫克，做為每天一次的劑量或每天兩次的劑量。

典型地，本申請案該藥學組成物可在餐前或餐後，或是於用餐時給藥。如同本文中所使用的，用餐「之前」或「之後」分別典型地是在開始或結束用餐的兩小時之內，較佳為一小時之內，更佳為三十分鐘之內，最佳為十分鐘之內。

現在已發現該分子式(I)化合物以及其藥學上可接受的鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）是由肝臟代謝，主要由細胞色素 P450 酵素代謝。細胞色素 P450（「CYP」）是主要的肝臟異生物質代謝酵素。有十一種異生物質代謝細胞色素 P450 在典型的人類肝臟中表現（即，CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8/9/18/19、CYP2D6、CYP2E1 以及 CYP3A4/5）。現在也已發現 CYP2D6 以及 CYP3A4 為主要的細胞色素 P450 異構物，其負責將該分子式(I)化合物以及其藥學活性鹽類（例如分子式(I)半酒石酸鹽）解毒。P450 酵素的活性量根據該個體而不同。例如，個體可被分類為差的、中等的以及大量的/超快速的 P450 代謝者。因為在個體中較低量的 P450 活性可造成藥物/藥物交互作用（「DDI」），本發明的另一個具體實施例是決定該個體是否為差的、中等的以及大量的/超快速的 P450 代謝者。如果該個體是中等的或大量的/超快速的代謝者，則給藥至那個個體的劑量應提高至「已調整之有效劑量」，即，導致該化合物之波谷血漿量為至少 5 ng/ml 的量；或導致該化合物之波谷量為至少 5 ng/ml，且該化合物之 C_{max} 低於 100 ng/ml 的量。可漸增地提高該劑量，並再測試該個體一次、兩次、

三次、四次或所需的許多次數，以達到已調整之有效劑量。

對於該 CYP 2D6 基因，有四種預測的表現型：

「差的 P450 代謝者」帶有兩個突變的等位基因，其導致完全失去酵素活性。

「中等的 P450 代謝者」具有一個減低活性的等位基因以及一個缺陷的等位基因。

「大量的 P450 代謝者」具有至少一個且不多於兩個正常功能的等位基因。

「超快速的 P450 代謝者」帶有多份（3-13）具功能的等位基因，並產生過多的酵素活性。

經由基因型鑑定或經由監控藥物的波谷血漿量而典型地評估個體是差的、中等的或大量的/超快速的 P450 代謝者，該藥物由 P450 酵素代謝，例如 CYP2D6 或 CYP3A4。通常，該分子式(I)化合物或其藥學上可接受的鹽類（包括分子式(I)半酒石酸鹽）的波谷血漿量及/或 C_{max} 在開始以該化合物治療之後，在該個體中被監控達一、二、三或四週，或達一、二、三、六、九或十二個月或更多。當需要時，對該劑量做出調整，以維持該量在所描述的限制內，即，在 5 ng/ml 或以上的波谷血漿量。

由於以某些為 P450 酵素抑制劑的藥物治療，個體可能變成差的 P450 代謝者。這種藥物的範例包括帕羅西汀、氟西汀、奎尼丁或克康那唑。或者，由於 P450 酵素的低度表現，個體是差的 P450 代謝者。在這種情況中，該低度表現可藉由測定在該個體中的 P450 酵素表現而評估，即，對該

個體進行該 P450 酵素的基因型鑑定。例如，CYP2D6 的表現通常藉由 PCR 評估 (McElroy et.al. "CYP2D6 Genotyping as an Alternative to Phenotyping for Determination of Metabolic Status in a Clinical Trial Setting", AAPS PharmSci (2000) 2(4):article 33 (<http://www.pharmsci.org/>))，或藉由微陣列為基礎的藥物基因體學測試來評估 (Background Information, Roche Diagnostics "The CYP450 Gene Family and Drug Metabolism", Hoffmann La Roche Ltd.)，其全部的教示被併入本文中以為參考。如此一來，在治療開始之前可對該個體方便地進行 P450 表現 (例如，CYP2D6) 的基因型鑑定，並且如果需要的話，給藥已調整之有效量。如果在治療開始之前進行基因型鑑定，仍建議監控該化合物的波谷血漿量以及 C_{max} ，並當需要時調整該劑量。

米加司他、agalsidase β 、伊米苷酶、Isofagomine 以及美格魯特的有效量如同該藥物標籤上描述，或如同每個藥物的臨床試驗來執行。

該分子式 (I) 化合物可與藥學可接受的酸反應，以形成藥學上可接受的鹽類。藥學可接受酸的範例包括無機酸，例如氫氯酸、氫溴酸、氫碘酸、硫酸、磷酸，以及諸如此類，以及有機酸，例如 p-甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、p-溴苯基-磺酸、碳酸、琥珀酸、檸檬酸、苯甲酸、醋酸，以及諸如此類。這種鹽類的範例包括該硫酸鹽、焦硫酸鹽、硫酸氫鹽、亞硫酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、磷酸氫鹽、磷酸二氫鹽、偏磷酸鹽、焦磷酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、

醋酸鹽、丙酸鹽、癸酸鹽、辛酸鹽、丙烯酸鹽、甲酸鹽、異丁酸鹽、己酸鹽、庚酸鹽、丙炔酸鹽、草酸鹽、丙二酸鹽、琥珀酸鹽、辛二酸鹽、癸二酸鹽、富馬酸鹽、馬來酸鹽、丁炔-1,4-二酸二甲酯、己炔-1,6-二酸二甲酯、苯甲酸鹽、苯甲酸氯、苯甲酸甲酯、二硝基苯甲酸鹽、羥基苯甲酸鹽、甲氧基苯甲酸鹽、酞酸鹽、磺酸鹽、二甲苯磺酸鹽、醋酸苯酯、苯基丙酸鹽、丁酸苯酯、檸檬酸鹽、乳酸鹽、gamma-羥基丁酸鹽、乙醇酸鹽、酒石酸鹽、甲磺酸鹽、丙磺酸鹽、萘-1-磺酸鹽、萘-2-磺酸鹽、杏仁酸鹽，以及諸如此類。

包含分子式(I)半酒石酸鹽的藥學組成物

該分子式(I)化合物或其藥學上可接受鹽類（包括該其半酒石酸鹽）的適合配方以及給藥模式包括美國專利編號第 7,253,185 號中所描述的那些，其全部的教示在本文中併入以做為參考。分子式(I)半酒石酸鹽的較佳配方描述於下列段落中。本發明的一個具體實施例是包含分子式(I)半酒石酸鹽、至少一水溶性填充料、至少一非水溶性填充料、至少一黏結劑以及至少一潤滑劑的藥學組成物，適合的水溶性填充料可包括，例如，無水乳糖、單水乳糖、甘露糖醇、氯化鈉、糖粉、山梨糖醇、蔗糖、肌醇以及預糊化澱粉。適合的非水溶性填充料可包括，例如，微晶纖維素、磷酸鈣以及澱粉。適合的黏結劑可包括，例如，預糊化澱粉、羧甲基纖維素鈉、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、

聚乙炔四氫咯酮、乙烯基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物、明膠、天然膠、澱粉糊、蔗糖、玉米糖漿、聚乙二醇以及藻酸鈉。適合的潤滑劑可包括，例如，氫化蔬菜油、硬脂酸鈣以及甘油山嶺酸酯。在該藥學組成物的一個具體實施例中，該水溶性填充料選自無水乳糖、單水乳糖、甘露糖醇、氯化鈉、糖粉、山梨糖醇、蔗糖、肌醇以及預糊化澱粉所組成的群組；該非水溶性填充料選自微晶纖維素、磷酸鈣以及澱粉所組成的群組，該黏結劑選自預糊化澱粉、羧甲基纖維素鈉、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙炔四氫咯酮、乙烯基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物、明膠、天然膠、澱粉糊、蔗糖、玉米糖漿、聚乙二醇以及藻酸鈉所組成的群組；以及該潤滑劑選自氫化蔬菜油、硬脂酸鈣，以及甘油山嶺酸酯所組成的群組。

該藥學分子式包含 8 wt%至 32 wt%之間、8 wt%至 24 wt%之間、12 wt%至 20 wt%之間或 14 wt%至 18 wt%之間的以乾固體為基礎的非水溶性填充料。

該藥學分子式包含 26 wt%至 50 wt%之間、30 wt%至 46 wt%之間、34 wt%至 46 wt%之間或 38 wt%至 44 wt%之間的以乾固體為基礎的水溶性填充料。

該藥學組成物包含 30 wt%與 45 wt%之間、35 wt%與 40 wt %之間以及 36 wt%至 39 wt %的以乾固體為基礎的分子式(I)半酒石酸鹽。

該藥學配方典型地包含 2 wt%與 6 wt%之間的以乾固體為基礎的黏結劑。

該藥學配方典型地包含 0.1 wt% 與 2 wt% 之間的以乾固體為基礎的黏結劑。

在特定的具體實施例中，該藥學分子式包含 8 wt% 至 32 wt% 之間的非水溶性填充料、26 wt% 至 50 wt% 之間的水溶性填充料、30 wt% 與 45 wt% 之間的分子式(I)半酒石酸鹽、2 wt% 與 6 wt% 之間的黏結劑以及 0.1 wt% 與 2 wt% 之間的黏結劑，全部均以乾固體為基礎。更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；以及該非水溶性填充料是微晶纖維素。甚至更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；該非水溶性填充料是微晶纖維素；該黏結劑是羥丙基甲基纖維素；以及該潤滑劑是甘油山喻酸酯。

在特定的具體實施例中，該藥學分子式包含 8 wt% 至 32 wt% 之間的非水溶性填充料、26 wt% 至 50 wt% 之間的水溶性填充料、35 wt% 與 40 wt% 之間的分子式(I)半酒石酸鹽、2 wt% 與 6 wt% 之間的黏結劑以及 0.1 wt% 與 2 wt% 之間的黏結劑，全部均以乾固體為基礎。更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；以及該非水溶性填充料是微晶纖維素。甚至更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；該非水溶性填充料是微晶纖維素；該黏結劑是羥丙基甲基纖維素；以及該潤滑劑是甘油山喻酸酯。

在另一個特定的具體實施例中，該藥學分子式包含 8 wt% 至 24 wt% 之間的非水溶性填充料、30 wt% 至 46 wt% 之間的水溶性填充料、35 wt% 與 40 wt% 之間的分子式(I)半酒石酸鹽、2 wt% 與 6 wt% 之間的黏結劑以及 0.1 wt% 與 2 wt%

之間的黏結劑，全部均以乾固體為基礎。更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；以及該非水溶性填充料是微晶纖維素。甚至更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；該非水溶性填充料是微晶纖維素；該黏結劑是羥丙基甲基纖維素；以及該潤滑劑是甘油山嶺酸酯。

在另一個特定的具體實施例中，該藥學分子式包含 12 wt% 至 20 wt% 之間的非水溶性填充料、34 wt% 至 46 wt% 之間的水溶性填充料、35 wt% 與 40 wt% 之間的分子式(I)半酒石酸鹽、2 wt% 與 6 wt% 之間的黏結劑以及 0.1 wt% 與 2 wt% 之間的黏結劑，全部均以乾固體為基礎。更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；以及該非水溶性填充料是微晶纖維素。甚至更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；該非水溶性填充料是微晶纖維素；該黏結劑是羥丙基甲基纖維素；以及該潤滑劑是甘油山嶺酸酯。

在另一個特定的具體實施例中，該藥學分子式包含 14 wt% 至 18 wt% 之間的非水溶性填充料、38 wt% 至 44 wt% 之間的水溶性填充料、35 wt% 以及 40 wt% 之間的分子式(I)半酒石酸鹽、2 wt% 與 6 wt% 之間的黏結劑以及 0.1 wt % 以及 2 wt % 之間的黏結劑，全部均以乾固體為基礎。更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；以及該非水溶性填充料是微晶纖維素。甚至更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；該非水溶性填充料是微晶纖維素；該黏結劑是羥丙基甲基纖維素；以及該潤滑劑是甘油山嶺酸酯。

在另一個特定的具體實施例中，該藥學分子式包含 14

wt%至 18 wt%之間的非水溶性填充料、38 wt%至 44 wt%之間的水溶性填充料、36 wt%與 39 wt%之間的分子式(I)半酒石酸鹽、2 wt %與 6 wt %之間的黏結劑以及 0.1 wt%與 2 wt%之間的黏結劑，全部均以乾固體基礎。更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；以及該非水溶性填充料是微晶纖維素。甚至更具體的是，該水溶性填充料是單水乳糖；該非水溶性填充料是微晶纖維素；該黏結劑是羥丙基甲基纖維素；以及該潤滑劑是甘油山喩酸酯。

本發明藉由下列範例描繪，其不意欲以任何方式限制。

實驗的

範例 1：分子式(I)鹽類的製備

分子式 I 的該半酒石酸鹽被立即地結晶化，且相較於其他的鹽類展現了許多有利的特性。例如，下列的酸被使用於由分子式(I)所表示之化合物鹽類的製備：檸檬酸（以 1：1、1：2 以及 1：3（鹽類：分子式 I）比例產生鹽類）；L-蘋果酸（1：1 以及 1：2）；甲磺酸（1：1）；富馬酸（1：1 以及 1：2）；氫氯酸（1：1）；醋酸（1：1）以及酒石酸（1：1 以及 1：2）。只有由氫氯酸（1：1）；酒石酸（1：1）以及酒石酸（1：2）所產生的鹽類是固體形式。發現這三種鹽類中的氫氯酸（1：1）以及酒石酸（1：1）的為吸濕性且非結晶性的，因此不能接受用於藥學產物。發現由分子式 I 所表示的該化合物之半酒石酸鹽（1 鹽類：2 分子式 I）為結晶性且非吸濕性的。

以丙酮製備分子式(I)半酒石酸鹽

藉由回流該溶液而將 L-酒石酸 (6.02 g, 40.11 mmol, 0.497 當量) 溶解於丙酮 (175 mL) 中，然後冷卻至室溫。在室溫下將分子式(I) 游離鹼 (32.67 g, 80.76 mmol) 溶解於丙酮 (300 mL) 中。在 15 分鐘的期間內於室溫下將該 L-酒石酸溶液加至該分子式(I) 游離鹼溶液中。經由該加入而在中途形成白色的沉澱。將該混合物於室溫下攪拌 0.5 小時，然後短暫地回流，並冷卻至室溫。在室溫下攪拌 0.5 小時後，過濾出該白色沉澱。以丙酮 (2 x 130 mL) 沖洗該白色的固體兩次。風乾該固體，然後在 55-60°C 下真空乾燥。該產量為 36.66g (95%)。

以於丙酮中的 5% 甲醇製備分子式(I)半酒石酸鹽

將分子式(I)游離鹼，10 g/24.7 mmol，溶解於 120 mL 或 240 mL 的 5% 甲醇/丙酮中。藉由加溫至 40-45 °C，將 L-酒石酸，1.85 g/12.3 mmol，溶解於 60 mL 或 120 mL 的 5% 甲醇/丙酮中 (N 或 2N)，以及將此溶液加至該第一溶液中。1 小時而無沉澱之後，加入 1 mg 的分子式(I)半酒石酸鹽做為種晶。5 分鐘之後發生沉澱，以及將該反應繼續攪拌 30 分鐘。然後將該反應在回流下加熱 5 分鐘 (該沉澱為完全可溶的)，然後在 20-22°C 的水浴中冷卻至室溫。沉澱形成，而將該反應繼續攪拌 3 小時。藉由過濾收集該最終產物，並以丙酮沖洗 (2 x 40 mL)，然後在真空烘箱中

於 55-60 °C 乾燥 16 小時。產物重量為 8.72 g/74%產率。

以於丙酮中的 1%水製備分子式(I)半酒石酸鹽

於室溫下將分子式(I)游離鹼 (10 g/24.7 mmol) 溶解於 120 mL 或 240 mL 的 1%水/丙酮中。藉由加溫至 40-45 °C 而將 L-酒石酸，1.85 g/12.3 mmol，溶解於 60 mL 或 120 mL 的 1%水/丙酮 (N 或 2N) 中，並將此溶液加至該第一溶液中。1 小時而無沉澱之後，加入 1 mg 的分子式(I)半酒石酸鹽做為種晶。在 5 分鐘之後發生沉澱，並將該反應持續攪拌 30 分鐘。然後將該反應在回流下加熱 5 分鐘 (該沉澱非完全可溶)，然後在 20-22°C 的水浴中冷卻至室溫。沉澱形成，而將該反應持續攪拌 3 小時。藉由過濾收集該最終產物，並以丙酮 (2 x 40 mL) 沖洗，然後在真空烘箱中於 55-60°C 乾燥 16 小時。產物重量為 8.62 g (73%產率)。

於丙酮中的 5%甲醇中再結晶分子式(I)半酒石酸鹽

在回流下將分子式(I)半酒石酸鹽 (3.06 g) 溶解於 116 mL 之於丙酮中的 5%甲醇中。將該溶液冷卻至室溫，並於室溫下攪拌 2 小時。過濾出該白色的沉澱，並以 10 mL 之於丙酮中的 5%甲醇沖洗，然後以丙酮 (15 mL) 沖洗。於 55-60°C 下真空乾燥 18 小時之後，得到 2.38 g 的分子式(I)半酒石酸鹽 (78%回收率)。

於丙酮中的 1%H₂O 中再結晶分子式(I)半酒石酸鹽

在回流下將分子式(I)半酒石酸鹽 (3.05 g) 溶解於 125 mL 之於丙酮中的 1% H₂O 中。將該溶液冷卻至室溫，並於室溫下攪拌 2 小時。過濾出該白色的沉澱，並以 10 mL 之於丙酮中的 1% H₂O 沖洗，然後以丙酮 (15 mL) 沖洗。於 55-60 °C 下隔夜真空乾燥之後，獲得 2.35 g 的分子式(I)半酒石酸鹽 (77%回收率) 。

範例 2：製備結晶的分子式(I)半酒石酸鹽

藉由數種方法結晶分子式(I)半酒石酸鹽。使用醋酸乙酯/丙酮溶劑，並在室溫下乾燥，以製備批次 1。使用醋酸乙酯/丙酮溶劑，並從醋酸乙酯再結晶，而製備出批次 3。使用批次 1 材料而從丙酮中再結晶出批次 4。從異丙醇中再結晶出批次 5。使用相似於批次 1 的醋酸乙酯/丙酮溶劑，但以大規模製備出批次 7。只使用丙酮而無進一步的再結晶作用以製備出批次 8。再次地無進一步的再結晶作用而只以短暫的回流使用丙酮來製備出批次 9。

表 1：分子式(I)半酒石酸鹽之批次 1-9 的多形性篩選摘要

批次編號	處理方法	DSC		顯微鏡	TGA
		熔點 (°C)	焓 (J/g)		
1	丙酮/醋酸乙酯沉澱	162	-81.4	結晶體	99.91%在 100°C 98.73%在 175°C
2	丙酮/醋酸乙酯沉澱 在室溫下乾燥*	164	-95.6	結晶體	N/A
3	丙酮/醋酸乙酯沉澱 在 55-60°C 下乾燥	166	-97.8	結晶體	100.0%在 100°C 99.98%在 153°C
4	從丙酮再結晶	166	-107.2	結晶體	100.2%在 100°C 100.2%在 153°C
5	從異丙醇再結晶	166	-102.6	結晶體	100.0%在 100°C 100.0%在 153°C



7	丙酮/醋酸乙酯沉澱	166	-99.4	結晶體**	100.1%在 100°C 99.91%在 153°C
8	丙酮沉澱	165	-100.7	結晶體**	100.0%在 100°C 100.0%在 153°C
9	短暫回流的丙酮沉澱	165	-100.2	結晶體**	

*：包含一些游離鹼在該 DSC 熱譜中

**：在這些批次中包含習性的改變，從桿狀、板狀變成針狀、桿狀以及不規則形狀

使用緩慢蒸發作用、緩慢冷卻、快速冷卻以及以各種溶劑的抗溶劑沉澱也製備出分子式(I)半酒石酸鹽的結晶體形式。

緩慢蒸發作用的方法。以等分測試溶劑處理已稱重的樣本（通常為 20 mg）。等分典型地為 100-200 L。在加入溶劑之間，搖動或超音波振盪該混合物。當該固體溶解時，藉由視覺檢查而判斷，在開放的小瓶中允許該溶液於室溫下蒸發，該開放的小瓶以針孔穿孔的鋁箔蓋著。基於加入的總溶劑而從這些實驗估計溶解度，以獲得澄清的溶液。

表 2：分子式(I)半酒石酸鹽在室溫（20-25°C）下的大約溶解度。

有機溶劑	大約的溶解度 (mg/mL)
庚烷	不可得
己烷	不可得
甲苯	<5
二氯甲烷	100
乙醇	29
異丙醇	<5

乙腈	<5
醋酸乙酯	<5
甲醇	>200
丙酮	<5
甲基 t-丁醚 (TBME)	<5
p-二噁烷	<5
四氫呋喃 (THF)	<5

表 3：使用緩慢蒸發作用方法之多形性的摘要。

有機溶劑	產生自緩慢 蒸發作用的 固體	DSC		顯微鏡	TGA
		熔點 (°C)	焓 (J/g)		
甲醇	否	N/A	N/A	N/A	N/A
乙醇	是	165	-95.0	結晶體 **	100.0%於100°C 100.0%於150°C

**：顆粒為板狀以及桿狀

緩慢/快速冷卻方法。在 50-60°C 下將分子式(I)半酒石酸鹽溶解於測試溶劑中。然後允許所產生的溶液冷卻至室溫（緩慢冷卻）。如果在一天之後沒有固體形成，將該小瓶放置在冰箱中。對於快速冷卻的實驗，然後允許所產生的溶液在冰箱中冷卻。藉由過濾以及風乾而收集該固體。

表 4：使用緩慢冷卻方法之多形性的摘要。

有機溶劑	產生自緩慢 冷卻的固體	DSC		顯微鏡	TGA
		熔點 (°C)	焓 (J/g)		
乙醇	是	167	-106.2	結晶體**	100.1%於 100°C 100.1%於 150°C

**：顆粒為板狀以及桿狀

表 5：使用快速冷卻方法之多形性的摘要。



有機溶劑	產生自快速 冷卻的固體	DSC		顯微鏡	TGA
		熔點 (°C)	焓 (J/g)		
乙醇	是	167	-106.2	結晶體**	100.0%於 100°C 100.0%於 150°C

**：顆粒為板狀以及桿狀

抗溶劑方法。將分子式(I)半酒石酸鹽溶解於溶劑中。
將抗溶劑加至該溶液中。藉由過濾以及風乾而收集該固體。

表 6：使用抗溶劑方法之多形性篩選摘要

有機溶劑	產生自抗溶劑 方法的固體	DSC		顯微鏡	TGA
		熔點 (°C)	焓 (J/g)		
甲醇/醋酸 乙酯	是	167	-99.5	結晶體*	100.1%於 100°C 100.1%於 150°C
甲醇/丙酮	是	167	-106.2	結晶體*	100.3%於 100°C 100.2%於 150°C
甲醇/乙腈	否	N/A	N/A	N/A	N/A
甲醇/甲苯	否	N/A	N/A	N/A	N/A
甲醇/THF	否	N/A	N/A	N/A	N/A
甲 醇 /TBME	否	167	-102.0	結晶體*	100.2%於 100°C 100.1%於 150°C
甲醇/p-二 噁烷	否	N/A	N/A	N/A	N/A
水/THF	否	N/A	N/A	N/A	N/A
水/TMBE	否	N/A	N/A	N/A	N/A
水/異丙醇	否	N/A	N/A	N/A	N/A
水/乙腈	否	N/A	N/A	N/A	N/A
水/丙酮	否	N/A	N/A	N/A	N/A
二氯甲烷/ 庚烷	是	165	-89.2	結晶體**	100.0%於 100°C 99.99%於 150°C
二氯甲烷/ 醋酸乙酯	是	167	-97.8	結晶體*	100.2%於 100°C 100.1%於 150°C

二氯甲烷/ 甲苯	是	164	-89.8	結晶體*	99.95%於 100°C 99.86%於 150°C
二氯甲烷 /TBME	是	167	-98.6	結晶體**	100.0%於 100°C 99.91%於 150°C
二氯甲烷 /p-二噁烷	是 (少)	N/A	N/A	N/A	N/A
二氯甲烷/ 異丙醇	否	N/A	N/A	N/A	N/A

- *：該顆粒為板狀以及桿狀。
- **：個別的顆粒具有多於一個雙折射色
- ***：該顆粒為針狀以及桿狀。

範例 3：分子式(I)半酒石酸鹽的物理特性

示差掃描熱析法 (DSC)。使用氮做為沖洗氣體而在 TA Q100 設備上收集 DSC 資料。將大約 2-5 mg 的樣本準確地稱重至鋁 DSC 稱盤上。該稱盤以蓋子蓋著，並以攝子穿孔。將該樣本細胞於 30°C 平衡，並以每分鐘 10°C 的速率加熱至 220°C 的最終溫度。

高溫載台顯微鏡檢查。使用裝設在 Leica DM LP 顯微鏡上的 Linkam 高溫載台 (型號 FTIR 600) 進行高溫載台顯微鏡檢查，該 Leica DM LP 顯微鏡配備有 Sony DXC-970MD 3CCD 照相機用以收集影像。以偏極光使用 40x 物鏡來觀看樣本。將每個樣本放在兩個蓋玻片之間。當該載台被加熱時，視覺地觀察每個樣本。使用 Links version 2.27(Linkam) 擷取影像。使用 USP 熔點標準校準該高溫載台。

在該 DSC 數據圖表觀察到的吸熱轉換藉由高溫載台顯微鏡檢查而被確認為在 160-163°C 溫度之間的熔化轉換。

範例 4：分子式(I)半酒石酸鹽的 X 光粉末繞射



所有的 X 光粉末繞射 (XRPD) 分析在 SSCI, Inc. (West Lafayette, IN 47906) 完成。使用 Shimadzu XRD-6000 的 X 光粉末繞射儀 (其使用使用 Cu K α 放射線) 來進行 XPRD 分析。該儀器配備有微焦 X 光管。該管電壓以及電流強度分別被設定為 40 kV 以及 40 mA。該發射以及散射狹縫被設定在 1°，且該接收狹縫被設定在 0.15 mm。藉由 NaI 閃爍偵測器偵測繞射的放射線。使用從 2.5 至 40° 2 θ 在 3°/分鐘 (0.4 秒/0.02° 刻度) 的該 theta-二 theta 連續掃瞄。分析矽標準品，以檢查儀器的校直。使用 XRD-6000 v 4.1 收集並分析資料。

範例 5: 分子式 (I) 半酒石酸鹽與分子式 (I) 游離鹼的比較

該游離鹼以及該半酒石酸鹽的固體特徵摘要於表 7 中。相較於分子式 I 游離鹼，分子式 I 半酒石酸鹽具有較好的特性。例如，分子式 I 半酒石酸鹽具有較高的熔點 (> 150 °C)、較高的堆積能 (較大的吸熱的焓)、顆粒大小的低變異、較高的水溶性 (在水中大於 300 mg/mL)、適合的晶體形狀以及相較於分子式 I 游離鹼之較高的總體密度。

表 7: 分子式 (I) 游離鹼以及分子式 (I) 半酒石酸鹽之固體狀態以及物理與化學特性的摘要。

物理特徵	分子式 (I) 游離鹼	分子式 (I) 半酒石酸鹽
熔點 (°C)	86-88	163
吸熱焓 (J/g)	75-82	96-106
顆粒大小 (µm)	<10 至 100	~ 3 (平均)
水溶性 (mg/mL)	0.04	>216
結晶	是	是

結晶體形狀	針狀	板狀、桿狀、一些不規則
吸濕性 (40°C/75%RH)	無	無
總體密度	~0.2	0.4-0.5

範例 6：試管內活性以及特異性

分子式 (I) 半酒石酸鹽在試管內對抑制醣神經鞘脂合成的活性。使用兩種分析法，以定量分子式 (I) 半酒石酸鹽對於葡萄糖神經醯胺合成酶的抑制活性。由於葡萄糖神經醯胺是在醣神經鞘脂生物合成中的第一與速率限制步驟，使用測量細胞表面 GM1 以及 GM3 量的流式細胞分析法以間接評估該抑制劑在完整細胞中的活性。以增加量的分子式 (I) 半酒石酸鹽 (0.6-1000 nM) 培養 K562 或 B16/F10 細胞 72 小時導致 GM1 以及 GM3 的細胞量的劑量依賴減少。在 K562 細胞中抑制細胞表面 GM1 表現的平均 IC_{50} 值是 24 nM (範圍為 14-34 nM) (表 8)，以及在 B16/F10 細胞中抑制細胞表面 GM3 表現的平均 IC_{50} 值是 29 nM (範圍為 12-48 nM)。即使在該最高劑量下測試時，在兩種細胞株中都沒有注意到明顯的細胞毒性。

活性的替代分析法測量了在源自人類細胞之微粒體中葡萄糖神經醯胺合成酶的抑制。在此分析法中，藉由超音波振盪以及離心而從人類黑色素瘤 A375 細胞製備出微粒體。將該微粒體的製備與螢光腦醯胺受質 (NBD-C6-腦醯胺)、UDP-葡萄糖以及增加量的分子式 (I) 半酒石酸鹽 (0-1000 nM) 在室溫下一起培養一小時。在該培養之後，

將螢光標記的葡萄糖神經醯胺以及未反應的腦醯胺分開，並藉由反相 HPLC 以及螢光偵測定量。在此分析法中，抑制葡萄糖神經醯胺合成的 IC_{50} 值範圍為 20 至 40 nM。此值類似於上述關於 GM1 以及 GM3 所獲得的值，且暗示著這些細胞表面醣脂質的測量是分子式(I)半酒石酸鹽對葡萄糖神經醯胺合成酶之活性的好代用品。

由分子式(I)半酒石酸鹽所抑制之受質合成抑制的特異性。在一連串以試管內細胞為基礎以及無細胞的分析法來評估分子式(I)半酒石酸鹽的特異性。在大鼠組織均質物中分析該腸醣苷酶酵素（見 U. Andersson, et al., Biochem. Pharm. 59 (2000) 821-829，其全部的教導在本文中併入以做為參考），以及如所描述的在無細胞分析法中分析肝醣去分支酶（見 U. Andersson, et al., Biochem. Pharm. 67 (2004) 697-705，其全部的教導在本文中併入以做為參考）。在高至 2500 μ M 的濃度下（表 8）沒有發現可偵測到的腸醣苷酶（乳糖酶、麥芽糖酶、蔗糖酶）、 α -葡萄糖苷酶 I 與 II 以及該細胞溶質去分支酶（ α -1,6-葡萄糖苷酶）抑制。

使用 C₆-NBD-葡萄糖神經醯胺作為受質，在完整人類細胞中分析非溶小體的葡萄糖神經醯胺酶以及溶小體的葡萄糖腦苷脂酶（見 H.S. Overkleeft, et al. J. Biol. Chem. 273 (1998) 26522-26527，其全部的教導在本文中併入以做為參考）。使用牛奶菜醇 β 環氧化物（一種特異的溶小體葡萄糖腦苷脂酶抑制劑）以區分溶小體對非溶小體的活性。也藉由螢光活性細胞分類法（FACS）測量葡萄糖腦苷脂酶活

性。在 $1\ \mu\text{M}$ 5-(五氟苯甲醯基胺基)-螢光二- β -D-吡喃葡萄糖苷 (PFB-FDGIu, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) 的存在下，以增加量的分子式(I)半酒石酸鹽培養 K562 細胞 30-60 分鐘。立即將細胞在冰上冰鎮，且所定量的螢光如上。該非溶小體的葡萄糖神經醯胺酶以 $1600\ \mu\text{M}$ 的 IC_{50} 而被微弱地抑制。在高至 $2500\ \mu\text{M}$ 的最高濃度下 (表 8) 仍沒有溶小體葡萄糖腦苷脂酶的抑制，該酵素在高雪氏症有缺陷。因此，相較於其他所測試的酵素，需要大約 40,000 的濃度差別以抑制葡萄糖神經醯胺合成酶。

表 8：分子式(I)半酒石酸鹽在試管中的生物活性

受質抑制潛力 (試管內 IC_{50}):	$\sim 0.024\ \mu\text{M}$
酵素特異性, IC_{50} :	
α -葡萄糖苷酶 I 以及 II:	$>2500\ \mu\text{M}$
溶小體葡萄糖腦苷脂酶 (GBA1):	$>2500\ \mu\text{M}$
非溶小體葡萄糖腦苷脂酶 (GBA2):	$1600\ \mu\text{M}$
肝醣去分支酶:	$>2500\ \mu\text{M}$
酵素特異性, K_i :	
蔗糖酶抑制:	無抑制至 $10\ \mu\text{M}$
麥牙糖酶抑制:	無抑制至 $10\ \mu\text{M}$

範例 7：在小鼠模型中溶小體葡萄糖神經醯胺量的改進處理

A. 法布瑞氏症

為了決定酵素取代療法 (ERT) 以及受質減少療法 (SRT) 兩種的合併使用是否可維持酵素減積 (debulking)

或提供額外的益處，在法布瑞氏症（法布瑞氏-Rag）的老鼠模型中比較分開以及合併療法的相對功效。親代的法布瑞氏小鼠描述於 Wang, AM et al. Am. J. Hum. Genet. 59: A208 (1996) 中。該法布瑞氏-Rag 與 RAG-1 小鼠交配，且不發育出成熟的淋巴球或 T-細胞（免疫不全）。

動物研究

對於該單一療法的研究，研究 1 個月大的法布瑞氏小鼠（預防模型）。治療組接受分子式(I)半酒石酸鹽（Genzyme Corp., Cambridge, MA）作為顆粒食物飲食。該藥物以 0.15%（w/w）配製於標準 5053 小鼠食物中（TestDiet, Richmond, IN），並隨意提供。此配方每天在 25 g 的小鼠中提供了 300 mg/kg 的分子式(I)半酒石酸鹽。

對於該合併療法的研究，研究 3 個月大的法布瑞氏-Rag 小鼠（治療模型）。在 A 組中的小鼠以每 2 個月 1mg/kg 的劑量（即 3、5、7 以及 9 個月大）接受重組人類 alpha-半乳糖苷酶 A（Genzyme Corp.）的靜脈注射。B 組接受相同的靜脈酵素劑量，加上其接受分子式(I)半酒石酸鹽（Genzyme Corp., Cambridge, MA）作為顆粒食物飲食。該藥物以 0.15%（w/w）配製於標準 5053 小鼠食物中（TestDiet, Richmond, IN），並隨意提供。此配方每天在 25 g 的小鼠中提供了 300 mg/kg 的分子式(I)半酒石酸鹽。C 組每 4 個月（即 3 以及 7 個月大）接受酵素注射，並使用與 B 組相同的食物中藥物飲食。D 組只接受該食物中藥物飲食（與 B 以及 C 組相同）。E 組為未治療的法布瑞氏-Rag 小鼠，以及 F 組為野生型的

控制組。見第 10 圖。

組織腦醯胺三聚己糖苷 (GL-3, Gb3) 量的定量

實際上如同對於 GL-1，藉由串聯質譜法定量 GL-3。如同先前所描述的來進行熱板分析法 (Ziegler, RJ et al. *Molec. Ther.* 15(3), 492-500 (2007))。

結果

使用分子式 (I) 半酒石酸鹽之法布瑞氏小鼠的單一療法在法布瑞氏症的小鼠模型中評估 SRT，該法布瑞氏症的小鼠模型是由 α -半乳糖苷酶 A 活性的缺乏而導致。使用分子式 (I) 半酒石酸鹽的療法以一個月大的法布瑞氏小鼠開始，並持續直到該小鼠達到一歲大。該動物以每天 300 mg/kg 的分子式 (I) 半酒石酸鹽於牠們的飲食中而給予劑量。雙月地進行該小鼠的行為測試（即，熱板分析法）以及生化測試（即，在組織/血液/尿液中的尿液分析以及 GL-3 量分析）。如第 7 圖中所示，在 11 個月的期間中將分子式 (I) 半酒石酸鹽給藥至法布瑞氏-Rag 小鼠減少了腦醯胺三聚己糖苷 (GL-3) 在身體器官（肝臟、腎臟、心臟以及脾臟）中溶小體累積的速率達接近 50%。這說明了疾病進展的延遲，其由對嫌惡熱刺激之感覺遲鈍的較遲表現（見第 8 圖），以及尿液分析因素惡化的預防（例如，尿液體積、肌酸酐以及鈉的量（見第 9 圖））而證明。因此，分子式 (I) 半酒石酸鹽媒介的葡萄糖神經醯胺合成酶（其催化醣神經鞘脂合成中的第一步驟）抑制不只在高雪氏症的動物模型中有益，也在法布瑞氏症的動物模型中有益，且也在其他的醣神經

鞘脂中具有正面的效果。

使用 α -半乳糖苷酶 A 以及分子式(I)半酒石酸鹽之法布瑞氏小鼠的合併療法

在五個族群的法布瑞氏-Rag 小鼠($n=12/\text{組}$)中評估 ERT 單獨以及與使用分子式(I)半酒石酸鹽之 SRT 合併的功效。在 3 個月大開始，如第 10 圖中所示，使該小鼠經歷行為測試的時程表（即熱板分析法）以及生化測試（即，在組織/血液/尿液中的 GL-3 量分析）。在經歷 ERT 的小鼠中，以如第 10 圖中所示的時程表給藥 1 mg/kg 劑量的 α -半乳糖苷酶 A。在經歷 SRT 的小鼠中，在該小鼠飲食中每天給藥 300 mg/kg 劑量的分子式(I)半酒石酸鹽。

如第 11 圖中所示，ERT 降低了法布瑞氏-Rag 小鼠中的血液 GL-3 量，而 SRT 則否。如第 12 圖中所示，合併 ERT/SRT 在降低法布瑞氏-Rag 小鼠肝臟以及腎臟中的 GL-3 量上是最有效的。

如第 13 圖中所示，SRT 降低了法布瑞氏-Rag 小鼠中的尿液 GL-3 量，而 ERT 則否。如第 14 圖中所示，SRT 延遲了法布瑞氏-Rag 小鼠中熱感覺遲鈍的開始，而非 ERT。

總而言之，以法布瑞酶以及分子式(I)半酒石酸鹽組合治療的法布瑞氏-Rag 小鼠以下述的方式展現了在疾病標記中的改善(其優於在治療模型中單獨的 ERT 或 SRT)：以合併療法顯著地降低了肝臟以及腎臟的 GL-3 累積；在 SRT 組中改善了尿液 GL-3；在 ERT 組中改善了血液 GL-3；以及

在 SRT 組中延遲了周邊神經病變。

B. 高雪氏症。為了決定酵素酵素取代療法 (ERT) 以及受質減少療法 (SRT) 兩者的連續使用是否可提供額外的益處，比較了在高雪氏症 (D409V/缺陷) 老鼠模型中之分開以及連續療法的相對功效。

方法

動物研究。牽涉動物的程序被檢閱，並由在 Genzyme 股份有限公司的機構動物照顧及使用委員會 (IACUC) 遵從由實驗動物管理評鑑及認證協會 (AAALAC) 發佈的指導方針所核准。該高雪氏小鼠 (D409V/缺陷) 是第 1 型高雪氏症的模型，其展現在肝臟、脾臟以及肺臟中的葡萄糖神經醯胺累積，但缺乏骨或腦的病變 (見 Y-H. Xu, et al., Am. J. Pathol. 163, 2003, 2093-2101，其全部的教導在本文中併入以做為參考)。研究 3 個月大之兩種性別的動物，如同先前實驗已指出的，在對於重組葡萄糖腦苷脂酶或分子式 (I) 半酒石酸鹽的反應上，雄性與雌性沒有差別。該研究具有 6 組小鼠，A 組在 2 週後犧牲，以提供組織葡萄糖神經醯胺的基線量。B、C 以及 D 組都每 2 天經由尾巴靜脈而由靜脈接受重組人類葡萄糖腦苷脂酶 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) (10mg/kg) (100 μ L)，共 8 次注射。B 組在此療法結束時犧牲 (與 A 組相同時間)，以提供組織葡萄糖神經醯胺的酵素減少量。D 以及 E 組都被餵食分子式 (I) 半酒石酸鹽 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) 作為該顆粒食物飲食的成分。該藥物以 0.075% (w/w) 配製於標準 5053 小

鼠食物中 (TestDiet, Richmond, IN)，並被隨意提供。此配方每天在 25 g 的小鼠中提供了 150 mg/kg 的分子式(I)半酒石酸鹽。F 組沒有接受治療，並與 C、D 以及 E 組一起在該研究開始之後 12 週犧牲。每週監控三次食物的消耗以及小鼠的重量，以決定藥物的攝入以及該藥物在整體健康上的潛在影響。動物藉由二氧化碳吸入而殺死，立即獲得牠們的組織。每個組織的一半在乾冰上快速冷凍，並儲存在 -80 °C，直到準備好進一步的處理。另外的一半進行組織學分析。

組織葡萄糖神經醯胺量的定量。如同先前所描述的，藉由質譜分析定量葡萄糖神經醯胺量（見 K. McEachern, et al., J. Gene. Med. 8 (2006) 719-729；T. Doering, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11038-11045，其兩者的全部教導在本文中併入以做為參考）。將已知質量的組織在 2：1 (v/v) 的氯仿：甲醇中均質化，並在 37°C 培養 15 分鐘。離心樣本，並以 0.2 的水於 4°C 下隔夜萃取該上清液。離心該樣本，丟棄該水相，並將該有機相於氮下乾燥成薄膜。對於電噴霧離子化質譜 (ESI/MS) 分析，組織樣本在 1 ml 的氯仿：甲醇 (2：1, v/v) 中溶解成 50 ng 原始組織重量的相等物，並劇烈混合 5 分鐘。每個樣本的等分 (40 µL) 運送至 Waters 樣本瓶 (Waters total recovery vial)，並加入 50 µL 的 10 µg/mL d3-C16 GL-1 內部標準品 (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA)。在氮下乾燥樣本，並以 200 µL 的 1：4 (v/v) DMSO：甲醇溶解。不同碳鏈長度的葡萄糖神經醯胺的

ESI/MS 分析在耦接至 Micromass Quattro 微系統的 Waters alliance HPLC (分離模組 2695) 上進行，該 Micromass Quattro 微系統配備有電噴霧離子源。於 45°C 下將脂質萃取樣本 (20 μ L) 注射至 C8 管柱 (4 mL X 3 mm i.d; Phenomenex, Torrance, CA) 上，並以 0.5 mL/分鐘、50 至 100% 乙腈 (2mM 醋酸銨，0.1% 甲酸) 的梯度洗提。該第一 0.5 分鐘維持在 50% 有機物，然後在最後 3.5 分鐘快速地切換至 100% 有機物。該來源溫度維持固定在 150°C，並以 670 L/h 的流速，使用氮作為去溶氣體。以 23 V 的錐電壓將該毛細管電壓維持在 3.80 KV，同時每個離子種類的駐留時間為 100 ms。藉由該 MRM 模式取得光譜，以監控八個主要的異構物 (C16:0、C18:0、C20:0、C22:1、C22:0、C22:1-OH、C24:1 以及 C24:0)。葡萄糖神經醯胺的定量基於相對於該內部標準品的這八個異構物之總合，使用範圍為 0.1 至 10 μ g/mL 的校正曲線。

組織學。對於組織學分析，組織在鋅福馬林 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 中於室溫下固定 24 小時，然後於 4°C 儲存在 PBS 中，直到準備好進一步的處理。所有的樣本在乙醇中脫水，在二甲苯中澄清、滲透，並在 Surgipath R 石蠟 (Surgipath, Richmond, IL) 中包埋。使用旋轉切片機切出 5 微米的切片，並在染色之前在 60°C 的烘箱中乾燥。切片在 Hemo-De (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) 中去除石蠟，並在梯降濃度的乙醇中再水和，接著以 PBS 沖洗。該切片以蘇木精以及嗜伊紅 (H&E) 染

色，並使用大鼠抗小鼠的 CD68 單株抗體 (Serotec, Raleigh, NC) 標記，以辨識巨噬細胞。在 PBS 中沖洗 5 分鐘之後，將該玻片於乙醇中脫水，並在以 SHUR/Mount™ 蓋玻片封片液 (TBS, Durham, NC) 封片之前在 Hemo-De 中澄清。以 MetaMorph (MDS Analytical Technologies, Toronto, Canada) 分析對每個組織切片使用 10 個 400X 的影像分析而定量在該肝臟中 CD68 免疫陽性的百分比區域。由不知道組別稱號的委員會認證獸醫病理學者檢驗所有的切片。

結果

用以在 3 個月大高雪氏小鼠之肝臟、脾臟以及肺臟中減量累積 GLI 的葡萄糖腦苷脂酶劑量療法。為了調查使用酵素或受質減少療法之單一療法以及合併的相對優點，首先決定在高雪氏小鼠之內臟器官中減少 GL1 量最多的酵素療法。將 2、4 或 8 劑量的 10 mg/kg 重組人類葡萄糖腦苷脂酶以靜脈給藥至 3 個月大的高雪氏小鼠 (D409V/缺陷)。以 2 或 4 劑量之酵素治療的小鼠每 3 天接受藥物的輸注，而那些以 8 劑量治的小鼠每 2 天接受該酵素。在接受 8 次治療之動物中，在輸注之間使用較短的時間間隔是設計為了最小化任何因給藥人類酵素而造成之任何免疫反應的潛在影響。在最後一次酵素輸注之後 7 天殺死該動物，並測量在牠們肝臟、脾臟以及肺臟中剩餘的 GL1 量。

2 劑量的葡萄糖腦苷脂酶治療減少了 50% 的肝臟中 GL1 量。如同所預期的，增加酵素輸注的次數至 4 或 8 將肝臟 GL1 量減低了更大的程度 (接近 75%)。即使使用 8 劑量，

該少於完全降低 GL1 量的情況與高雪氏個體中的經驗一致，該高雪氏個體顯示肝脾腫大只在延長治療時期之後減小（見 G.A. Grabowski, et al., *Ann. Int. Med.* 122 (1995) 33-39，其全部的教導在本文中併入以做為參考）。高雪氏小鼠脾臟中受質的量對於酵素治療更有抗性。相較於那些未治療的控制組，2 劑量的葡萄糖腦苷脂酶給藥並不顯著地改變 GL1 量。將酵素輸注的次數增加至 4 或 8 減少了脾臟的 GL1 量達大約 50%。在肺臟中，在 8 劑量之後觀察到減少至未治療的控制組的約 60%。在肺臟中受質減少的些許降低程度可能是因為該輸注酵素對於富含脂質的肺泡巨噬細胞具有較差的可親性。相較於該脾臟以及肺臟，在肝臟觀察到較高的 GL1 清除可能反映了系統性輸注之後的酵素生物分佈（見 S.M. Van Patten, et al. *Glycobiology* 17 (2007) 467-478，其全部教導被併入以作為參考）。基於這些結果，以 2 天的間隔、由 8 次連續的 10 mg/kg 葡萄糖腦苷脂酶劑量給藥所構成的治療療法被使用於後續的研究。

酵素與受質減少療法以降低高雪氏小鼠肝臟中 GL1 量的相對能力。數群 3 個月大的高雪氏小鼠以重組葡萄糖腦苷脂酶或分子式(I)半酒石酸鹽分開地或連續地治療。如上所描述的，在 B、C 以及 D 組中的小鼠被給予 8 劑量的酵素（在 2 週的期間之間），以清除累積的 GL1。然後將一般的食物或包含分子式(I)半酒石酸鹽（150 mg/kg/天）的食物餵食給不同組（餵食額外的 10 週），以沒有接受治療的 F 組作為空白控制組（naïve control）。不管該食物的配方，

該小鼠吃了可比較量的食物，且在重量的增加上沒有可識別的差別。在 2 週的單獨酵素療法之後，接近 80% 的儲存 GL1 量從肝臟中清除。當允許這些動物發展而無進一步治療達 10 週時，牠們的肝臟 GL1 量增加，指示出該受質的再次累積在這中間的期間中發生（第 2 圖，C 柱）。這些量與那些未治療的控制組（第 2 圖，F 柱）沒有顯著的不同。然而，如果以酵素治療該小鼠，然後分子式(I)半酒石酸鹽在牠們的食物中超過 10 週的期間，牠們的肝臟 GL1 量顯著地低於該未治療的控制組（第 2 圖，D&F 柱）。此結果暗示著使用分子式(I)半酒石酸鹽的額外治療已減慢該受質的再次累積。有趣的是，當相較於未治療、年齡相符的控制組（第 2 圖，F 柱）時，在整個研究期間（12 週）單獨以分子式(I)半酒石酸鹽治療的高雪氏小鼠也顯示出較低的 GL-1 量（第 2 圖，E 柱），雖然這個差異並不顯著。在此動物模型中，SRT 單獨以減少 GL1 量的能力與我們先前的報告一致（見 K.A. McEachern, *et al.*, *Mol. Genet. Metab.* 91 (2007) 259-267，其全部的教導在本文中併入以做為參考），且可能反映出該高雪氏小鼠（D409V/缺陷）保留殘餘酵素活性的事實（見 Y-H. Xu, *et al.*, *Am. J. Pathol.* 163, 2003, 2093-2101，其全部的教導在本文中併入以做為參考）。

酵素與受質減少療法以降低高雪氏小鼠脾臟中 GLI 量的相對能力。單獨以重組葡萄糖腦苷脂酶治療 3 個月大高雪氏小鼠 2 週減少了脾臟的 GL1 量達大約 60%（第 3 圖，B 柱）。當允許這些動物額外成長 10 週而無進一步的干預時，

該受質的量回到該研究開始所觀察到的量(第3圖, C柱), 且與該未治療的控制組沒有顯著的不同(第3圖, F柱)。這暗示著該脾臟中 GL1 的再次累積速率高於肝臟中的再次累積速率。這個假設也由觀察到脾臟中的受質基礎量 (~1500 mg/g 組織; 第2圖, A柱) 比肝臟中的受質基礎量 (~500 mg/g 組織; 第3圖, A柱) 還高而支持。已經以酵素治療, 然後以分子式(I)半酒石酸鹽治療接下來10週的動物顯示了脾臟 GL1 量的最大減少(第3圖, D柱), 且這些顯著地低於那些未治療控制組脾臟中的量(第3圖, F柱)。這指出 SRT 的調度不僅延遲了受質的再次累積, 也作用以進一步減少此器官中儲存的負擔。明顯的是, 至少在此例子中, 殘餘內生性酵素以及受質減少的淨效果導至整體受質量的進一步下降。在單獨以分子式(I)半酒石酸鹽治療12週的小鼠中(第3圖, E柱)觀察到比未治療之控制組(第3圖, F柱)還低的脾臟 GL1 量與此見解一致, 雖然該差異並不顯著。因此, 在具有高殘餘酵素活性的輕微高雪氏第1型病患中, 以 ERT 治療接著以 SRT 治療可潛在地加速該速率, 且或許甚致增進引起問題之受質的清除程度。

酵素與受質減少療法以降低高雪氏小鼠肺臟中 GL1 量的相對能力。如同稍早所提到的, 藉由重組葡萄糖腦苷脂酶的靜脈給藥對於肺臟 GL1 量的清除是最沒有有效的。以酵素治療3個月大高雪氏小鼠2週只導致肺臟中的受質量減少30%(第4圖, B柱)。如所預期的, 接著10週被餵食

正常食物的該群動物顯示了 GL1 的再次累積，且與未治療中的量沒有顯著不同的（第 4 圖，C&F 柱）。相對照地，在相同期間餵食包含分子式(I)半酒石酸鹽食物的動物顯示了在單獨給藥酵素的動物之下的受質量減少（第 4 圖，D 柱），且顯著地比那些未治療的控制組低（第 4 圖，F 柱）。再次地，這暗示著在肺臟中，如同在脾臟中，分子式(I)半酒石酸鹽的淨效果（在存在殘餘的內生性酵素活性時）不僅延遲了 GL1 的再次累積，也作用以進一步將它們減少至低於起始量。至於其他的內臟器官，當相較於未治療的控制組（第 4 圖，F 柱）時，藉由單獨分子式(I)半酒石酸鹽的治療在降低肺臟 GL1 量上是有效的（第 4 圖，E 柱）。

在酵素以及受質減少治療之後之高雪氏小鼠肝臟的組織病理學分析。為了看得到肝臟中不同醫療療法的效果，對組織切片進行 CD68 的染色，其為巨噬細胞的標識。分析來自未治療之 3 個月大高雪氏小鼠的肝臟切片顯示了大量脂質吞食、CD68 陽性之高雪氏細胞的存在，當 12 週以後分析時，該高雪氏細胞大部分維持沒有改變。與上述生化資料一致，在 2 週的期間給藥重組葡萄糖腦苷脂酶之動物的肝臟顯示了在這些不正常巨噬細胞中脂質的大量清除。如果允許這些動物額外成長 10 週而無進一步的治療，如同高雪氏細胞的再次出現所指出的，有 GL1 再次累積的證據。然而，如果在相同的期間之間，該小鼠被給予使用分子式(I)半酒石酸鹽的受質減少療法，則在高雪氏細胞的這種增加被否定。如同先前所提及的，只接受分子式(I)半酒

石酸鹽的高雪氏小鼠也顯示了該受質累積的減少，雖然與接受 ERT 以及 SRT 組合的小鼠程度不同。也使用 MetaMorph 軟體（第 18 圖）定量在各種切片上 CD68 陽性染色的程度。這些切片中染色的程度反映了以生化法所決定的肝臟 GL1 量（第 15 圖），進一步支持對於不同治療療法之相對優點的假設。

範例 8：在高雪氏症小鼠模型中分子式(I)半酒石酸鹽的
功效

動物研究。牽涉動物的程序被檢閱，並由機構動物照顧及使用委員會（IACUC）遵從州與聯邦的實驗動物管理評鑑及認證協會（AAALAC）的指導方針所核准。根據研究需求，允許該高雪氏 $gba^{D409V/null}$ 小鼠（見 Y.-H. Xu. et al., Am. J. Pathol. 163 (2003) 2093-2101，其全部的教導在本文中併入以做為參考）成熟。在雄性與雌性之間沒有發現表現型或對分子式(I)半酒石酸之反應的差異，所以兩種性別都被使用於該研究中。分子式(I)半酒石酸鹽藉由每天單次的口服強飼以 10 mL/kg 的體積運送。在治療開始之前一週，使用類似體積的水使動物適應口服強飼。將分子式(I)半酒石酸鹽溶解於水用於注射（WFI；VWR, West Chester, PA），並在 9 天的過程期間，以 75 mg/kg/天至 150 mg/kg/天的逐步增加劑量給藥，每個劑量給予 3 天，並以 25 mg/kg/天來漸增。每週稱重小鼠 3 次，以監控該藥物在牠們整體健康上的潛在影響。動物藉由二氧化碳吸入而殺死，並立

即獲得牠們的組織。每個組織的一半在乾冰上快速冷凍，並儲存在 -80°C ，直到準備好進一步的處理。另外的一半進行組織學分析。

藉由高效能薄層層析定量組織葡萄糖神經醯胺的量。高效能薄層層析 (HP-TLC) 分析如同所描述 (A. Abe, *et al.*, *J. Clin. Inv.* 105 (2000) 1563-1571; H. Zhao, *et al.* *Diabetes* 56 (2007) 1341-1349; 以及 S.P.F. Miller, *et al.* *J. Lab. Clin. Med.* 127 (1996) 353-358, 其每個的全部教導在本文中併入以作為參考)。簡而言之，藉由在冷 PBS 中均質化組織而獲得總脂質片段，以 2:1 (v/v) 氯仿: 甲醇萃取，並在水浴超音波振盪機中超音波振盪。將樣本離心，以分開該相，並重新獲得上清液。將該沉澱再次於氯仿: 甲醇: 食鹽水中超音波振盪、離心，並收集所產生的第二上清液，並與第一上清液結合。將 1:1 (v/v) 的氯仿: 食鹽水混合物加至所結合的上清液，將其劇烈混合，並離心。在丟棄上層的水層之後，加入甲醇: 食鹽水，將其劇烈混合並再次離心。取出該有機相並在氮下乾燥，將其以每 0.1 g 原始組織重量溶解於 1 mL 的 2:1 (v/v) 氯仿: 甲醇中，並儲存於 -20°C 。

使用一部分的該脂質萃取物以測量總磷酸鹽，(見 B.N. Ames, *Methods Enzymol.* 8 (1966) 115-118, 其全部的教導在本文中併入以做為參考)，即，該磷脂質含量，以使用作為內部標準品。將該剩餘物進行鹼性甲醇分解，以移除在該 HP-TLC 盤上與葡萄糖神經醯胺一起移動的磷脂質。將

包含該總磷酸鹽相等量的萃取物等分與已知的葡萄糖神經醯胺標準品點在 HP-TLC 盤上 (Matreya inc. Pleasant Gap, PA)。以 3% 醋酸銅單水合物 (w/v)、15% 磷酸 (v/v) 將該脂質分解並使其可見，接著在 150°C 烘烤 10 分鐘。在密度計上掃描該脂質帶 (GS-700, Bio-Rad, Hercules, CA)，並以 Quantity One 軟體 (Bio-Rad) 分析。

藉由質譜分析定量組織葡萄糖神經醯胺量。如同所描述的，藉由質譜分析定量葡萄糖神經醯胺 (見 K. McEachern, *et al.* J. Gene Med. 8 (2006) 719-729; T. Doering, *et al.*, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11038-11045，其每個的全部教導在本文中併入以做為參考)。在 2:1 (v/v) 氯仿: 甲醇中將組織均質化，並於 37°C 下培養。將樣本離心，並將該上清液以 0.2 體積的水隔夜萃取。再次離心該樣本，丟棄該水相，並將該有機相在氮下乾燥成薄膜。

對於電噴霧離子化質譜 (ESI/MS) 分析，將組織樣本於 1 mL 的氯仿/甲醇 (2:1, v/v) 中溶解成 50 ng 原始組織重量的相等物，並劇烈混合 5 分鐘。每個樣本的等分 (40 μ L) 運送至 Waters 樣本瓶中，並加入 50 μ L 的 10 μ g/mL d3-C16-GL-1 內部標準品 (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA)。在氮下乾燥樣本，並將其以 200 μ L 的 1:4 DMSO: 甲醇溶解。不同碳鏈長度之葡萄糖神經醯胺的 ESI/MS 分析在耦接至 Micromass Quattro 微系統的 Waters alliance HPLC (分離模組 2695) 上進行，該 Micromass Quattro 微系統配備有電噴霧離子源。於 45°C 下將 20 微升的脂質萃取樣本

注射至 C8 管柱(4 ml x 3 mm i.d; Phenomenex, Torrance, CA) 上，並以 0.5 mL/分鐘、50-100%乙腈 (2mM 醋酸銨，0.1% 甲酸) 的梯度洗提。該第一 0.5 分鐘維持在 50%有機物，然後在最後 3.5 分鐘快速地切換至 100%有機物。該來源溫度維持固定在 150°C，並以 670 L/h 的流速，使用氮作為去溶氣體。以 23 V 的錐電壓將該毛細管電壓維持在 3.80 KV，同時每個離子種類的駐留時間為 100 ms。藉由該 MRM 模式取得光譜，以監控八個主要的異構物 (C16: 0、C18: 0、C20: 0、C22: 1、C22: 0、C22: 1-OH、C24: 1，以及 C24: 0)。葡萄糖神經醯胺的定量基於相對於該內部標準品的這八個異構物之總合，使用範圍為 0.1 至 10 µg/mL 的校正曲線。

組織學。對於組織學分析，組織在鋅福馬林 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 中於室溫下固定 24 小時，然後於 4°C 儲存在 PBS 中，直到準備好進一步的處理。所有的樣本在漸增濃度的乙醇中脫水，在二甲苯中澄清並滲透，並在 Surgipath R 石蠟 (Surgipath, Richmond, IL) 中包埋。使用旋轉切片機切出 5 微米的切片，並在染色之前在 60°C 的烘箱中乾燥。切片在二甲苯中去除石蠟，並在梯降濃度的酒精中再水和，接著以水沖洗。在 3%醋酸中潤洗 1 分鐘之後，玻片在 3%醋酸、pH 2.0 中的 1%阿爾新藍 8GX (Electron Microscopy Sciences) 中染色 40 分鐘。在水中潤洗，並在 1%過碘酸中氧化 1 分鐘之後，以西夫試劑 (Schiff's reagent) (Surgipath) 將玻片染色 12 分鐘。在

熱水中沖洗 5 分鐘之後，將該玻片於乙醇中脫水，並在以 SHUR/Mount™ 蓋玻片封片液（TBS, Durham, NC）封片之前在二甲苯中澄清。每 10 個高倍視野（HPFs, 400x）使用人工細胞計數來定量在肝臟中以形態學辨識的高雪氏細胞。

結果

將分子式(I)半酒石酸鹽給藥至 D409V/缺陷型小鼠的影響

將分子式(I)半酒石酸鹽給藥至 D409V/缺陷型小鼠的效果被評估。藉由口服強飼將 150 mg/kg/天的分子式(I)半酒石酸鹽（在初步研究中所示有效抑制葡萄糖神經醯胺合成酶的劑量）給藥大約 7 個月大的小鼠達 10 週。此治療對於該小鼠的福祉或餵食習慣沒有顯著的影響。

在整個研究中牠們重量的測量顯示與未治療小鼠的重量沒有顯著偏差，其暗示著針對顯示為有效抑制該合成酶之劑量的分子式(I)半酒石酸鹽具有良好的耐受性。

分子式(I)半酒石酸鹽在治療年輕、前驅症狀的高雪氏小鼠的功效。評估在年輕（10 週大）D409V/缺陷小鼠中分子式(I)半酒石酸鹽對於葡萄糖神經醯胺的溶小體累積的減少以及高雪氏細胞外觀的影響。這些年輕的高雪氏小鼠在受影響的組織中展現了低量的 GL-1。藉由口服強飼而將 75 或 150 mg/kg/天的分子式(I)半酒石酸鹽給藥至 10 週大的動物達 10 週。當相較於年齡相符之載體治療的控制組時，葡萄糖神經醯胺量的測量顯示了劑量依賴的減少。在已經以

150 mg/kg/天治療的群組中，在肝臟、肺臟以及脾臟中，葡萄糖神經醯胺量分別為控制組的 60、40 以及 75%(第 6 圖)。在受治療之 D409V/缺陷型小鼠的肝臟以及肺臟中所觀察到統計學上顯著較低量的葡萄糖神經醯胺指出分子式(I)半酒石酸鹽在減低這些組織中此醣神經鞘脂的累積是有效的。

在該研究結束時(20 週大)，未治療之 D409V/缺陷型小鼠的肝臟組織病理學評估顯示高雪氏細胞存在於整個肝臟中。以 150 mg/kg/天的分子式(I)半酒石酸鹽治療 10 週的小鼠顯示只有偶爾存在的高雪氏細胞，該高雪氏細胞的大小也總是較小。在許多不同切片中這些細胞的定量確認了在以分子式(I)半酒石酸鹽治療的小鼠中高雪氏細胞的頻率顯著地較低。綜合上述，這些生化以及組織學發現暗示著將分子式(I)半酒石酸鹽每天給藥至前驅症狀的高雪氏小鼠對於降低受影響之組織中葡萄糖神經醯胺的累積以及肝臟中高雪氏細胞隨之發生的形成是有效的。

分子式(I)半酒石酸鹽在治療具有預先存在病變之較老高雪氏小鼠的功效。也評估了在較老、具症候之高雪氏小鼠中，分子式(I)半酒石酸鹽在停滯或逆轉疾病進展的功效。藉由口服強飼而將 150 mg/kg/天的分子式(I)半酒石酸鹽給藥至 7 個月大的 D409V/缺陷型小鼠達 10 週。在治療後 5 以及 10 週，在治療小鼠之肝臟、肺臟以及脾臟中的葡萄糖神經醯胺量分析顯示它們沒有增加超過該研究開始所觀察到的量。改變 10 週的治療，相較於以載體治療的小鼠，決定葡萄糖神經醯胺量在肝臟中降低 60%，在肺臟中降低

50%，以及在脾臟中降低 40%。這些結果顯示分子式(I)半酒石酸鹽在具有儲存病變之現存負擔的小鼠中，其對於抑制葡萄糖神經醯胺的進一步累積是有效的。

當相較於未治療的控制組時，在受治療之 D409V/缺陷型小鼠肝臟中，組織切片的組織病理學分析顯示了降低數量的高雪氏細胞。高雪氏細胞數量的定量證實了生化的發現；在 5 以及 10 週的時間點時，受治療之 D409V/缺陷型小鼠展現的高雪氏細胞數與治療開始的高雪氏細胞數並無顯著的不同。在這兩個時間點的高雪氏細胞數量顯著地低於未治療之 D409V/缺陷型小鼠的數量。綜上所述，這些資料顯示在具有預先存在病變的動物中，分子式(I)半酒石酸鹽有效地抑制了進一步的葡萄糖神經醯胺累積以及高雪氏細胞發育。

討論

分子式(I)半酒石酸鹽對於該酵素葡萄糖神經醯胺合成酶展現了高度的特異性。在該有效劑量下，也沒有可測量到的葡萄糖腦苷脂酶活性的抑制，其當治療高雪氏症第 1 型病患時是一個重要的特徵，大部分的該高雪氏症第 1 型病患保留了殘餘的葡萄糖腦苷脂酶活性。在 150 mg/kg/天的有效劑量下，沒有可觀察到的腸胃問題，且在受治療以及未治療的控制組之間沒有體重上的差異。使用口服劑量可立即達到該 IC₅₀ (24-40 nM) 以及其以上的血清濃度，該口服劑量低於最大耐受量。分子式(I)半酒石酸鹽也被立即地代謝以及清除：如同在大鼠與狗中以 ¹⁴C 放射性標幟的

單一以及重覆口服劑量 ADME 研究中所示的，兩種母化合物以及代謝物在 24 小時內被有效地代謝。

使用非最佳化劑量療法的單一每日口服強飼成功地預防了年輕、具前驅症候之小鼠以及已展現儲存病變之較老高雪氏小鼠中葡萄糖神經醯胺的累積。相對於野生型控制組，該年輕、10 週大的小鼠雖然擁有升高的葡萄糖神經醯胺量，但卻沒有發展出具吞噬組織特徵的巨噬細胞，也就是高雪氏細胞。以 150 mg/kg/天的分子式(I)半酒石酸鹽治療停止了所有可測量到的疾病進展，並抑制了高雪氏細胞的發育。在展現較高量溶小體葡萄糖神經醯胺以及較多高雪氏細胞的較老小鼠中，在 5 週或 10 週的治療之後，該醯神經鞘脂的量或儲存細胞的數量沒有進一步的增加。由於在高雪氏細胞中，葡萄糖神經醯胺的主要來源被報導為細胞外的來源，因此這些結果暗示著分子式(I)半酒石酸鹽對葡萄糖神經醯胺合成酶的抑制是系統性的。

觀察到分子式(I)半酒石酸鹽在預防葡萄糖神經醯胺的進一步累積是有效的，其建議出可進一步增強高雪氏症治療的醫療策略。

總而言之，此處所呈現的資料展現了分子式(I)半酒石酸鹽是一種具活性以及特異性的葡萄糖神經醯胺合成酶抑制劑，其在高雪氏症的小鼠模型中沒有展現出明顯的反效果。其在具有前驅症候以及較老具疾病的高雪氏小鼠中，都藉由抑制葡萄糖神經醯胺的累積以及高雪氏細胞的形成而成功地預防了疾病的進展。這些發現暗示著分子式(I)半

酒石酸鹽可代表對於小兒科與成人高雪氏第 1 型疾病以及其他醣神經鞘脂儲存失調的另一醫療選擇。

範例 9：分子式(I)半酒石酸鹽的第 2 階段臨床試驗

方法。此分子式(I)半酒石酸鹽的臨床試驗，以每日兩次口服地給予 50 或 100 mg 來治療在 5 個國家中 7 個位置的 26 個具有第 1 型高雪氏症（GD1）的成人（16F：10M；平均年齡 34 歲，範圍 18-60；全部為高加索人）。病患將具有脾腫大（體積 10 正常），且具有血小板減少症（血小板 45,000-100,000/mm³）或貧血（女性血紅素 8-10 g/dl；男性 8-11 g/dl）。在先前的 12 個月中沒有人接受過酵素取代或受質減少療法。該複合的主要功效終點是在 52 週的治療之後的血球蛋白量（+0.5 g/dl）或血小板數（+15%）。也評估肝臟體積、幾丁三糖酶（chitotriosidase）、葡萄糖神經醯胺。病患持續被治療並長期監控。

結果。高達 20 個病患的第 52 週資料為可用的；其他 4 個提早退出，以及 2 個正在進行。20 個病患中的其中 19 個達到該複合的主要終點。從基線至第 52 週的平均（1 SD）改變為：血紅素 +1.6（11.35）g/dL；血小板數 +43.6%（137.59%）；脾臟以及肝臟體積分別為（正常的倍數）40.2%（110.44%）以及 15.8%（110.39%）；以及幾丁三糖酶 49.9%（120.75%）。在所有的病患中，血漿葡萄糖神經醯胺的量在 4 週後變成正常，分子式(I)半酒石酸鹽以可接受的安全數據而被良好耐受著。在 6 個病患中已報告出相關的 7 個

相關不利事件；所有的相關不利事件在本質上都為輕微且短暫的。

範例 10：分子式(I)半酒石酸鹽藥學組成物，100 mg 膠囊

100 mg 膠囊的製備方法。將分子式(I)半酒石酸鹽、微晶纖維素、單水乳糖以及羥丙甲纖維素 E15 分開通過 20 篩孔的篩子。表 9 中所指出篩選過成分的量在高剪切製粒機中混合 9 至 12 分鐘。

表 9 · 100 mg 膠囊的藥學配方

成分	單位量		
	單位量 100mg 膠囊 (mg)	每單位劑量% (% w/w)	名義上的批次大小：71,000 膠囊總量 19.2kg
分子式(I)半酒石酸鹽	100.0	37.0	7.1
微晶纖維素	45.0	16.7	3.2
單水乳糖	111.5	41.3	7.9
羥丙甲纖維素，E15	10.8	4.0	0.8
甘油山嶺酸酯	2.7	1.0	0.2
填充重量 (mg)	270		248-292 mg
總共%組成物		100.0	19.2 kg

然後藉由將純水（2.2 kg；11.7%的乾成分重量）加至製粒機碗中而將該成分弄濕粒化，直到經由視覺確認完成。將該濕造粒從該碗中排出，並穿過旋轉推動器、篩選磨粉機。然後將該濕造粒在直接加熱、固定的、固體、床、盤乾燥箱中於 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 乾燥，至藉由製程中檢查所確認的，

含水量不大於 3.5%。然後該乾顆粒通過篩選磨粉機，並將所篩選的顆粒轉置至 V 形攪拌機中。將甘油山嶺酸酯 (0.2 kg) 加至該 V 形攪拌機中，並混合最終的混合物直到該混合物經由線內或線外混合均勻性測試所決定為均勻，其典型地混合 10 至 20 分鐘。然後使用半自動的膠囊填充機而將該最終混合物裝入 #2 號大小的膠囊中，以達到適當的填充重量 (平均 270 mg)，且在包裝之前將所填充的膠囊除塵。

範例 11A：分子式 (I) 半酒石酸鹽藥學組成物，10 mg 膠囊

10 mg 膠囊的製備方法。遵從範例 10 的程序直到該膠囊封裝步驟。為了製造 10 mg 膠囊，使用膠囊填充機器而將該最終混合物裝在 #4 或 #5 號大小的膠囊中，以達到適當的填充重量 (平均 27 mg)，且在包裝之前將所填充的膠囊除塵。

範例 11B：分子式 (I) 半酒石酸鹽藥學組成物，50 mg 膠囊

50 mg 膠囊的製備方法。遵從範例 10 的程序直到該膠囊封裝步驟。為了製造 50 mg 膠囊，使用膠囊填充機器而將該最終混合物裝在 #3 號大小的膠囊中，以達到適當的填充重量 (平均 135 mg)，且在包裝之前將所填充的膠囊除塵。

範例 11C：分子式 (I) 半酒石酸鹽藥學組成物，150 mg 膠囊

150 mg 膠囊的製備方法。遵從範例 10 的程序直到該膠囊封裝步驟。為了製造 150 mg 膠囊，使用膠囊填充機器而將該最終混合物裝在 #0 號大小的膠囊中，以達到適當的填充重量（平均 405 mg），且在包裝之前將所填充的膠囊除塵。

範例 12：分子式(I)半酒石酸鹽藥學組成物，25 mg 膠囊

25 mg 膠囊的製備方法。遵從範例 10 的程序直到該膠囊封裝步驟。為了製造 25 mg 膠囊，使用膠囊填充機器而將該最終混合物裝在 #4 號大小的膠囊中，以達到適當的填充重量（平均 67.5 mg），且在包裝之前將所填充的膠囊除塵。

範例 13：分子式(I)半酒石酸鹽藥物交互作用 -CYP2D6 抑制劑

進行研究以評估藥物動力學、與帕羅西汀（每天 30 mg）一起或不與帕羅西汀一起給藥之多重口服劑量的分子式(I)半酒石酸鹽（100 mg BID）的安全性與耐受性、CYP2D6 的可能抑制劑。此為在 36 個健康個體中的開放標籤、固定順序的研究（17 個男性以及 19 個女性）。第二個目標是評估帕羅西汀與多重劑量之分子式(I)半酒石酸鹽（100 mg BID）的組合在健康個體中的 PK，並進一步評估相較於單一劑量分子式(I)半酒石酸鹽給藥，在多重劑量之後的分子式(I)半酒石酸鹽 PK。

當其存在於血漿時，分子式(I)半酒石酸鹽之游離鹼的

平均 PK 參數不是線性，且相較於單一劑量給藥，重覆給藥（100 mg BID）在 AUC 以及 C_{max} 顯示了 2 倍的累積。當相較於分子式(I)半酒石酸鹽儘多重劑量給藥時，分子式(I)半酒石酸鹽以及帕羅西汀的相伴給藥導致在 C_{max} 增加 7 倍以及 AUC 增加 9 倍。這些結果指出帕羅西汀可抑制分子式(I)半酒石酸鹽的代謝，並增加該藥物的血液血漿濃度。預期其他的有效 CYP2D6 抑制劑（例如，氟西汀以及奎尼丁）會有類似的效果，且當分子式(I)半酒石酸鹽與已知為有效 CYP2D6 抑制劑的藥物共同給藥時，小心地監控藥物血漿量以及調整潛在的劑量是必要的。帕羅西汀的濃度約比預期的高 1.5 至 2 倍，其暗示著分子式(I)半酒石酸鹽或其中一種其代謝物可為輕微的 CYP2D6 抑制劑。

範例 14：分子式(I)半酒石酸鹽藥物的交互作用 -CYP3A4 抑制劑以及 p-糖蛋白（PGP）抑制劑

進行研究以評估在健康男性與女性個體中的藥物動力學、安全性、以及與多重劑量克康那唑（400 mg 每天一次）一起或不與多重劑量克康那唑一起給藥之多重劑量的分子式(I)半酒石酸鹽（100 mg 一天兩次）的耐受性。此為在 36 個健康個體中的開放標籤且固定順序的研究（18 個男性以及女性），由 3 個期間所組成，包括分子式(I)半酒石酸鹽的 100-mg 單一劑量給藥、分子式(I)半酒石酸鹽的多重劑量給藥、以及分子式(I)半酒石酸鹽 100 mg（一天兩次）與克康那唑 400 mg（一天一次）的相伴給藥。當其以穩定的狀態存在於血漿中時，分子式(I)半酒石酸鹽以及克康那唑的

重覆給藥導致該分子式(I)半酒石酸鹽之游離鹼曝露增加 4 倍，克康那唑為細胞色素 p450 3A4 (「CYP 3A4」) 以及 p-醣蛋白的強烈抑制劑。因此，當以 CYP 3A4 或 p-醣蛋白的強烈抑制劑進行相伴療法時，已接受分子式(I)半酒石酸鹽的病患可能需要暫時的劑量減少。

範例 15-分子式(I)半酒石酸鹽配方的穩定度研究

藉由在閃爍瓶中以約 2 克的規模混合分子式(I)半酒石酸鹽以及賦形劑 (單水乳糖膠囊等級、艾維素 PH 301 (微晶纖維素) 以及美多秀 E15 Prem LV (羥丙基甲基纖維素)) 而製備混合物。將 15.6% 的水加至該混合物，並將其混合以形成濕粒。使用 #10 號篩網 (2000 微米的開口) 篩選該濕粒。然後在烘箱中以 50°C 乾燥篩選過的顆粒 2 小時。使用 #18 號篩網 (1000 微米的開口) 篩選乾燥後的顆粒。將潤滑劑、甘油山嶺酸酯加至該混合物中，並將其混合，以形成最終的混合物。該混合物的製備示於下表中：

表

批次#	AP	單水乳糖	艾維素 PH 101	50 mg/100 mg 配方	註釋
1	1	2.1	2.1	50	控制組
2	1	2.1	0	50	沒有艾維素
3	1	0	2.1	50	沒有乳糖
4	1	2.1	1.1	50	較少艾維素
5	1	1.1	2.1	50	1 較少乳糖
6	1	2.1	0.8	50	可與 100 mg 相比的艾維素以及乳糖比例

7	1	1.1	0.4	100	控制組
---	---	-----	-----	-----	-----

以 2 至 4%的範圍使用美多秀 (HPMC)

以 1 至 1.6%的範圍使用山嵛酸甘油酯 ATO 88

該 7 種配方混合物，其具有上述所列出的不同 API：乳糖：艾維素比例，被曝露於 85°C 的高溫 3 天（強制降解研究條件），以了解該降解速率以及每種配方的穩定度。基於該研究結果而選擇此加速的條件，該研究結果為，在 24 個月，該 50mg 藥物產物的降解產物程度與在 85°C 中 3 天所獲得的那些降解產物程度類似。

使用反相梯度 HPLC 方法進行該強制降解研究，該反相梯度 HPLC 方法使用 C18 管柱（Waters T3, 3µm, 100 x 4.6 mm），移動相由水以及具有 0.1%之三氟醋酸（TFA）的乙腈組成，在 280 nm 下進行 UV 偵測，管柱溫度為 40°C，以及流速率為 2 mL/分鐘。該梯度開始於維持在 5%B（乙腈以及 0.1%TFA）0.5 分鐘，然後以每分鐘 4.83% B 提升有機成分，達 15 分鐘。

將每種配方混合物的總降解產物加總，並按照 API：乳糖：艾維素的比例繪圖，且該結果示於第 15 圖中。該研究結果暗示著，當維持該 API 以及乳糖比例固定時，減少艾維素的量增進了該配方的穩定度。當移除艾維素時，該配方具有 1：2.1：0 的 API：乳糖：艾維素比例，其是最穩定的配方。當移除乳糖時，該配方具有 1：0：2.1 的 API：乳糖：艾維素比例，相較於其他的比例，此配方不是最不穩定的。所結合的資訊暗示著，乳糖穩定了該配方，而艾維



素使該配方不穩定。然而，當兩種賦形劑都存在時，它們彼此交互作用。該比例大部分已被調整以獲得穩定的配方。

對於活性藥學成分，像是具水溶性的分子式(I)半水合物，在濕造粒期間，因為微晶纖維素不溶於水，其有助於形成顆粒。如果不使用微晶纖維素，在顆粒階段至糊狀物會發生急劇的改變。該糊狀物是難以處理的，且在乾燥後所產生的顆粒不具有適合的機械強度與顆粒大小分佈。關於所形成之降解產物的量而言，具有 37 wt%之分子式(I)半酒石酸鹽、41.0 wt%之水溶性填充料；16.7 wt%之不可溶填充料、2 wt%至約 6 wt%之黏結劑；以及約 0.1 wt%至約 2 wt%之潤滑劑的該藥學組成物（全部為乾固體基礎）具有最穩定的數據。

本文中所引用的所有專利、已公開之申請案以及參考文獻的教導，其全部內容被併入以作為參考。

雖然在此已特別示出並以參考而描述以作為其具體實施例之範例，本領域之技術人員將了解的是，其中可做出在形式與細節上的各種改變，而不背離所附帶之申請專利範圍所包含的範圍。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示了分子式(I)半酒石酸鹽的實驗性 XRPD 圖案（室溫）。

第 2 圖是酵素與受質減少療法於降低高雪氏小鼠肝臟中葡萄糖神經醯胺量之功效的圖表。在未治療的 3 個月大

高雪氏小鼠(A)中以及接下來 2 個星期以重組葡萄糖腦苷脂酶治療(B)的小鼠中測量肝臟 GL1 量。以重組葡萄糖腦苷脂酶治療的小鼠不經進一步治療而在 10 週後分析(C)或在以 150 mg/kg 分子式(I)半酒石酸鹽飼食的療法之後(D)分析。也顯示出了在整個研究期間單獨給藥分子式(I)半酒石酸鹽之小鼠(E)以及未治療的、年齡相符之控制組(F)肝臟中的 GL1 量。資料以平均 $\pm$ 該平均的標準誤差 (SEM) 來表示 ($n = 5$)。使用非成對 t 檢定來決定統計學上的顯著性。

第 3 圖是酵素與受質減少療法於降低高雪氏小鼠脾臟中葡萄糖神經醯胺量之功效的圖表。在未治療的 3 個月大高雪氏小鼠(A)中以及接下來 2 個星期以重組葡萄糖腦苷脂酶治療(B)的小鼠中測量脾臟 GL1 量。以重組葡萄糖腦苷脂酶治療的小鼠不經進一步治療在 10 週後分析(C)或在分子式(I)半酒石酸鹽的療法之後(D)分析。也顯示出了在整個研究期間單獨給藥分子式(I)半酒石酸鹽之小鼠(E)以及未治療的、年齡相符之控制組(F)脾臟中的 GL1 量。資料以平均 $\pm$ 該平均的標準誤差 (SEM) 來表示 ($n = 5$)。使用非成對 t 檢定來決定統計學上的顯著性。

第 4 圖是是酵素與受質減少療法於降低高雪氏小鼠肺臟中葡萄糖神經醯胺量之功效的圖表。在未治療的 3 個月大高雪氏小鼠(A)中以及接下來 2 個星期以重組葡萄糖腦苷脂酶治療(B)的小鼠中測量肺臟 GL1 量。以重組葡萄糖腦苷脂酶治療的小鼠不經進一步治療在 10 週後分析(C)或在分子式(I)半酒石酸鹽的療法之後(D)分析。也顯示出了在整個

研究期間單獨給藥分子式(I)半酒石酸鹽之小鼠(E)以及未治療的、年齡相符之控制組(F)肺臟中的 GL1 量。資料以平均 $\pm$ 該平均的標準誤差 (SEM) 來表示 ($n = 5$)。使用非成對 t 檢定來決定統計學上的顯著性。

第 5 圖是示出肝臟中 CD68 染色程度定量的圖表。使用 MetaMorph 軟體定量在肝臟切片上的 CD68 陽性染色程度。所顯示的是在未治療的 3 個月大高雪氏肝臟中的量(A)或接下來以葡萄糖腦苷脂酶治療的量(B)。也描繪了以酵素治療,然後不經進一步醫療干預而在 10 週後分析(C)或在分子式(I)半酒石酸鹽的療法後(D)分析的小鼠。也顯示出了單獨給藥分子式(I)半酒石酸鹽之高雪氏小鼠(E)以及未治療的、年齡相符之控制組小鼠(F)肝臟中的染色程度。從來自每個小鼠每切片 10 個 400x 影像的分析來校對資料。使用非成對 t 檢定來決定統計學上的顯著性。

第 6 圖是顯示分子式(I)半酒石酸鹽在年輕 D409V/缺陷型小鼠中功效的圖表。藉由口服強飼以 75 或 150 mg/kg 的劑量將分子式(I)半酒石酸鹽每天給藥至 10 週大的 D409V/缺陷型小鼠,給藥 10 週。藉由 HP-TLC 在該研究結束時評估在肝臟、肺臟、脈管構造以及脾臟中的葡萄糖神經醯胺量。資料以未治療之年齡相符的控制組小鼠中 GL-1 的百分比來表示。虛線指出在正常野生型小鼠中所觀察到的葡萄糖神經醯胺量。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ 相對於未治療的控制組(雙尾、非成對 t 檢定)。資料以平均 $\pm$ 該平均的標準誤差 (SEM) 來表示(對於 75 mg/kg, $n = 5$; 對於 150 mg/kg,

n = 6) 。

第 7 圖顯示分子式(I)半酒石酸鹽療法對法布瑞氏小鼠肝臟、心臟、腎臟、脾臟、腦以及血液中 GL-3 累積的效果。

第 8 圖顯示分子式(I)半酒石酸鹽療法對法布瑞氏小鼠中周邊神經病變起始與進展之效果的圖表。

第 9 圖顯示以分子式(I)半酒石酸鹽治療之法布瑞氏小鼠中腎臟功能的一些標記之測量的圖表。

第 10 圖顯示接受不同藥物療法之小鼠族群的 ERT 以及 SRT 研究的時間進程：A)法布瑞酶，雙月地，無分子式(I)半酒石酸鹽；B)法布瑞酶，雙月地，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；C)在該研究的開始以及在該研究的第 4 個月給藥法布瑞酶，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；D)無法布瑞酶，分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；以及 E)無藥物療法。

第 11 圖顯示在六個族群(n=?)的小鼠血液中 (A-E 法布瑞氏-Rag；以及 F 野生型) 血液 GL-3 量 (ng/mL) 的圖表；該小鼠族群接受了下述療法：A)法布瑞酶，雙月地，無分子式(I)半酒石酸鹽；B)法布瑞酶，雙月地，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；C)在該研究的開始以及在該研究的第 4 個月給藥法布瑞酶，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；D)無法布瑞酶，分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；E)無藥物療法；以及 F)無藥物療法。

第 12 圖顯示在法布瑞氏-Rag 小鼠肝臟以及腎臟中 GL-3 量的圖表；該小鼠族群 (n=?) 接受了下述療法：A)

法布瑞酶，雙月地，無分子式(I)半酒石酸鹽；B)法布瑞酶，雙月地，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；C)在該研究的開始以及在該研究的第4個月給藥法布瑞酶，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；D)無法布瑞酶，分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；以及E)無藥物療法。

第13圖顯示在法布瑞氏-Rag小鼠中尿液GL-3量的圖表；該小鼠族群(n=?)接受了下述療法：A)法布瑞酶，雙月地，無分子式(I)半酒石酸鹽；B)法布瑞酶，雙月地，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；C)在該研究的開始以及在該研究的第4個月給藥法布瑞酶，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；D)無法布瑞酶，分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；以及E)無藥物療法。

第14圖是顯示接受下述療法之法布瑞氏-Rag小鼠的熱敏感性延遲(秒)的圖表：法布瑞酶，雙月地，無分子式(I)半酒石酸鹽；法布瑞酶，雙月地，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；在該研究的開始以及在該研究的第4個月給藥法布瑞酶，以及分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；無法布瑞酶，分子式(I)半酒石酸鹽在食物中；無藥物療法；野生型小鼠；以及在三個月未治療。

第15圖是顯示在已曝露於85°C、3天之後，各種混合之HPLC紀錄的降解區域總量的圖表，該各種混合包含分子式(I)半酒石酸鹽、膠囊等級的單水乳糖以及艾維素PH 301(微晶纖維素)。該HPLC紀錄的降解區域是相應於降解之峰的總區域相對於相應於分子式(I)半酒石酸鹽與降解產物

之峰的總區域的比例。

【主要元件符號說明】

無

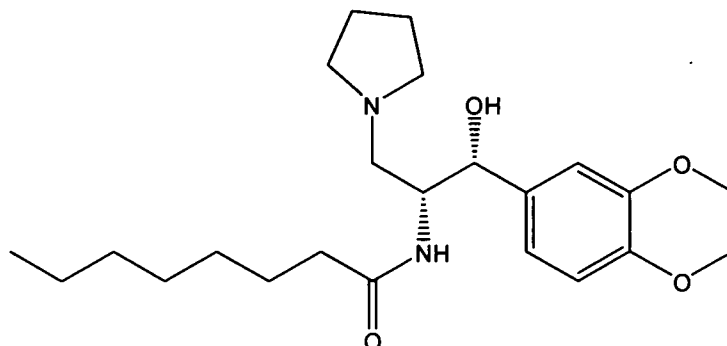
105年8月16日 修正
備註

公告本

105年8月16日替換頁

七、申請專利範圍：

1. 一種由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽，

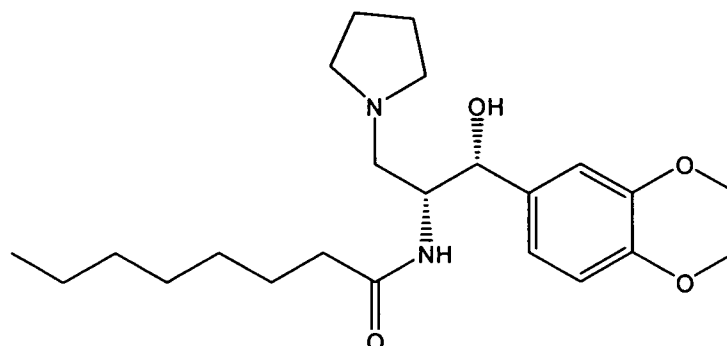


其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少一個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述的半酒石酸鹽，其中該半酒石酸鹽係選自 D-半酒石酸鹽、L-半酒石酸鹽、半內消旋酒石酸 (hemimesotartaric acid) 或外消旋 D,L-半酒石酸鹽。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述的半酒石酸鹽，其中該半酒石酸鹽為 L-半酒石酸鹽。

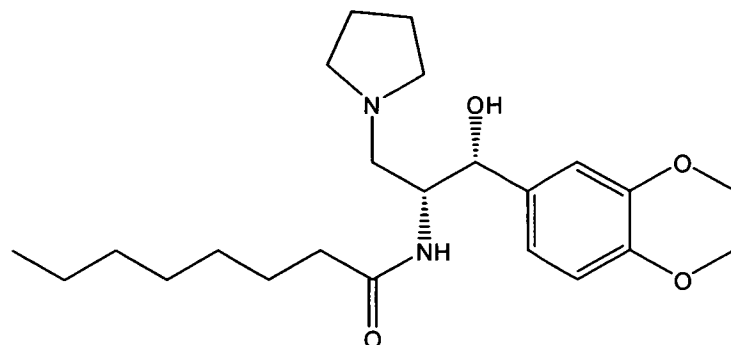
4. 一種由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽，



其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少兩個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ

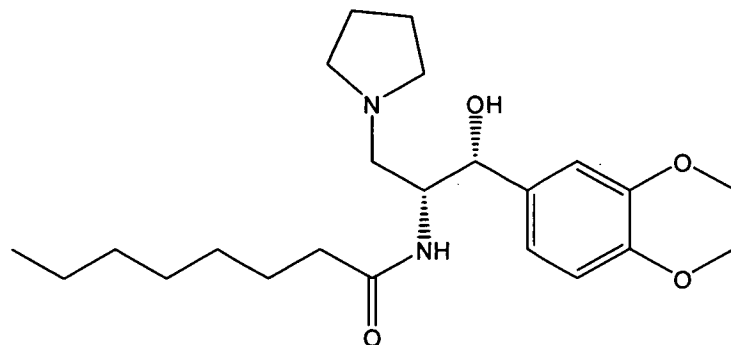
角之主要 X 光粉末繞射峰。

5. 一種由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽，



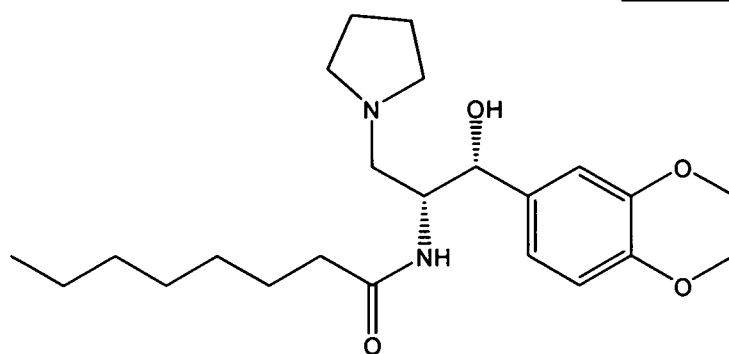
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少三個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

6. 一種由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽，



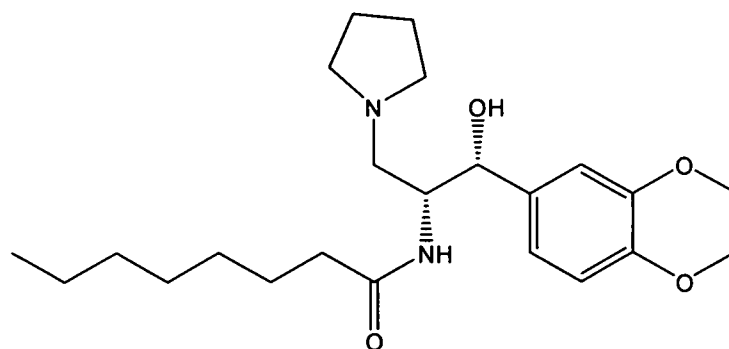
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少四個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

7. 一種由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽，



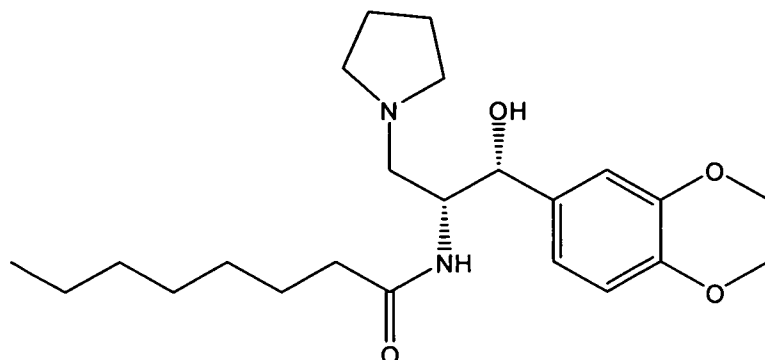
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

8. 一種由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽，



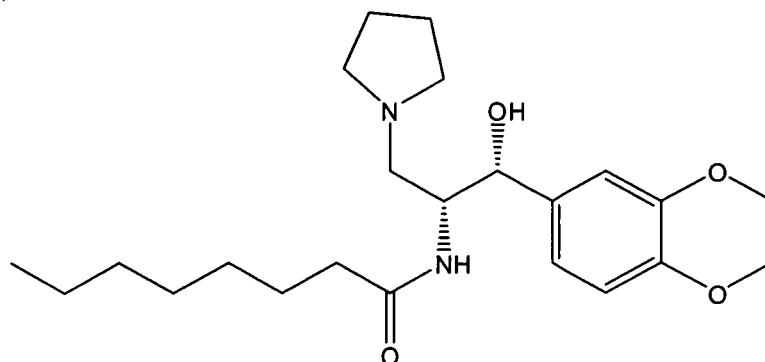
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 13.3° 、 15.1° 、 15.9° 、 16.5° 、 17.6° 、 18.6° 、 18.7° 、 19.0° 、 20.2° 、 21.7° 以及 23.5° 的 2θ 角之 X 光粉末繞射峰。

9. 一種藥學組成物，其包含由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽及藥學上可接受的載體或稀釋劑，



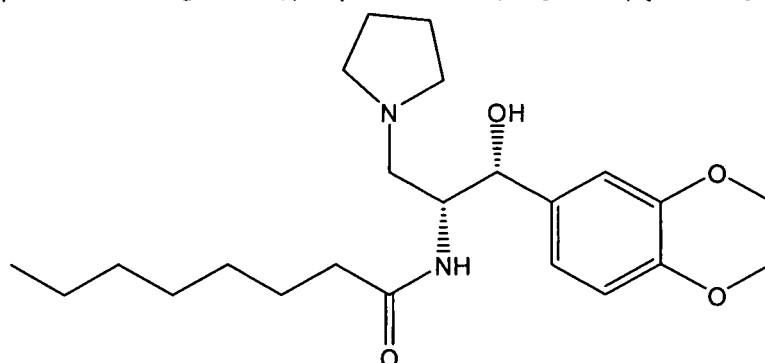
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少一個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

10. 一種藥學組成物，其包含由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽及藥學上可接受的載體或稀釋劑，



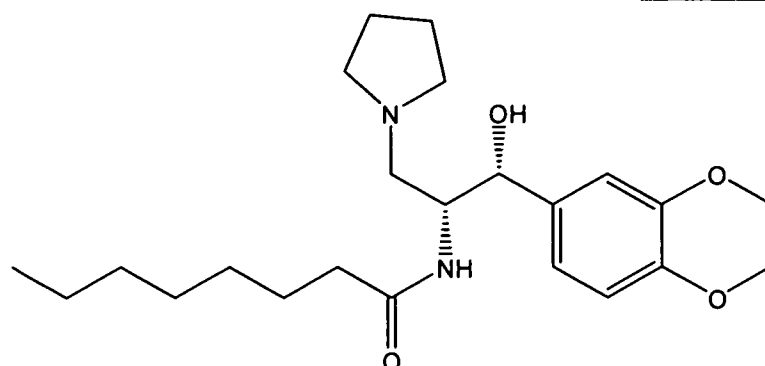
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少兩個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

11. 一種藥學組成物，其包含由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽及藥學上可接受的載體或稀釋劑，



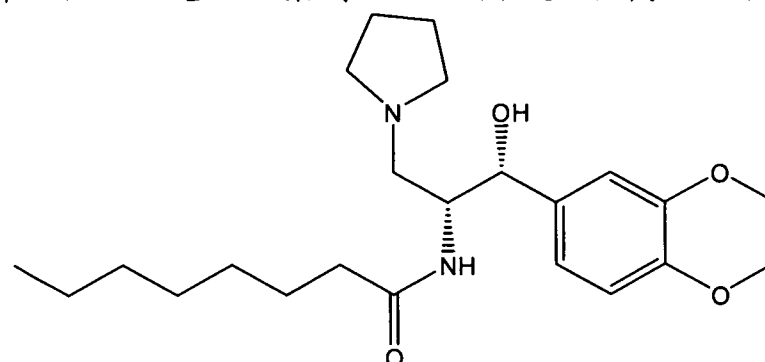
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少三個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

12. 一種藥學組成物，其包含由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽及藥學上可接受的載體或稀釋劑，



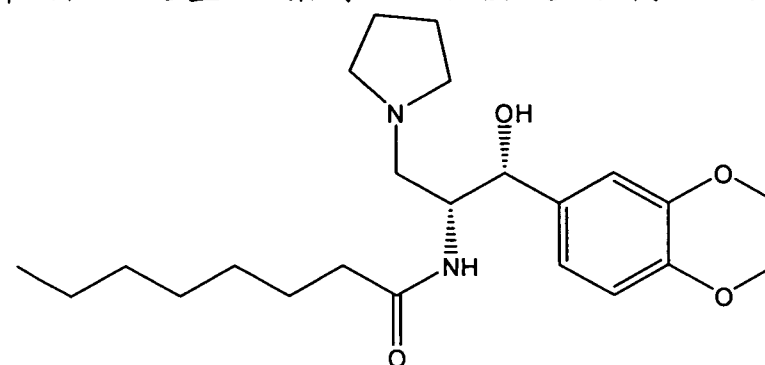
其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於至少四個在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

13. 一種藥學組成物，其包含由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽及藥學上可接受的載體或稀釋劑，



其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 15.9° 以及 21.7° 的 2θ 角之主要 X 光粉末繞射峰。

14. 一種藥學組成物，其包含由以下結構分子式所表示之化合物的半酒石酸鹽及藥學上可接受的載體或稀釋劑，



其中該鹽係呈結晶形式，該結晶形式的特徵在於在 5.1° 、 6.6° 、 10.7° 、 11.0° 、 13.3° 、 15.1° 、 15.9° 、 16.5° 、 17.6° 、 18.6° 、 18.7° 、 19.0° 、 20.2° 、 21.7° 以及 23.5° 的 2θ 角之 X 光粉末繞射峰。

15. 一種如申請專利範圍第 1-8 項中任一項的半酒石酸鹽之用途，其係用於製造用以治療具有高雪氏症（Gaucher disease）的個體之醫藥品。

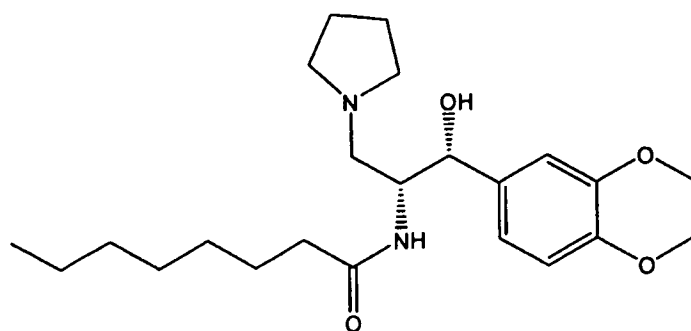
16. 一種如申請專利範圍第 1-8 項中任一項的半酒石酸鹽之用途，其係用於製造用以治療具有法布瑞氏症（Fabry disease）的個體之醫藥品。

17. 一種如申請專利範圍第 1-8 項中任一項的半酒石酸鹽之用途，其係用於製造在需要其的個體中抑制葡萄糖神經醯胺合成酶或降低醣神經鞘脂（glycosphingolipid）濃度之醫藥品。

18. 如申請專利範圍第 15、16 或 17 項所述的用途，其中該醫藥品係以每日兩次給藥，其中該半酒石酸鹽的劑量為 25 毫克至 200 毫克。

19. 如申請專利範圍第 15、16 或 17 項所述的用途，其中該醫藥品係以每日兩次給藥，其中該半酒石酸鹽的劑量為 50 毫克。

20. 一種由下述結構分子式所表示的第一醫療劑或其藥學上可接受的鹽類之用途，



其係用於製造用以治療具有高雪氏症的個體之醫藥品，其中該醫藥品與有效量的第二醫療劑結合而給藥，該第二醫療劑有效於治療高雪氏症。

21.如申請專利範圍第 20 項所述的用途，其中該第二醫療劑是伊米甘酶（imiglucerase）。

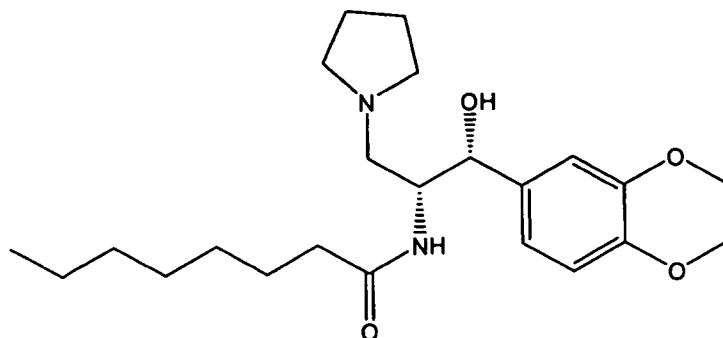
22.如申請專利範圍第 20 項所述的用途，其中該第二醫療劑是 isofagomine。

23.如申請專利範圍第 20 項所述的用途，其中該第二醫療劑是美格魯特（miglustat）。

24.如申請專利範圍第 20 項所述的用途，其中該第二醫療劑是 Taliglucerase。

25.如申請專利範圍第 20 項所述的用途，其中該第二醫療劑是 Velaglucerase。

26.一種由下述結構分子式所表示的第一醫療劑或其藥學上可接受的鹽類之用途，



其係用於製造用以治療具有法布瑞氏症的個體之醫藥品，其中該醫藥品與有效量的第二醫療劑結合而給藥，該第二醫療劑有效於治療法布瑞氏症。

27.如申請專利範圍第 26 項所述的用途，其中該第二醫療劑是米加司他（migalastat）。

28.如申請專利範圍第 26 項所述的用途，其中該第二醫療劑是 agalsidase β 。

29.如申請專利範圍第 26 項所述的用途，其中該第二醫療劑是 agalsidase α 。

30.如申請專利範圍第 20-29 項中任一項所述的用途，其中所給藥之該醫藥品中的第一醫療劑是如申請專利範圍第 1-8 項中任一項所述的半酒石酸鹽。

31.如申請專利範圍第 20-29 項中任一項所述的用途，其中使用該醫藥品的治療在使用該第二醫療劑治療超過至少 10 週的期間之後開始。

32.如申請專利範圍第 20-29 項中任一項所述的用途，其中使用該醫藥品的治療在使用該第二醫療劑治療之後開始，以及其中使用該醫藥品的治療在該個體的血小板數等於或大於 $100,000 \text{ mm}^3$ ；血紅素濃度等於或大於 11 g/dl （女性）或 12 g/dl （男性）；及/或該個體的脾臟體積小於或等於正常的 10 倍且肝臟體積小於或等於正常的 1.5 倍之後才開始。

33.如申請專利範圍第 31 項所述的用途，其中使用該第二醫療劑的治療在開始使用該醫藥品治療之後結束。

34.如申請專利範圍第 32 項所述的用途，其中使用該第二醫療劑的治療在開始使用該醫藥品治療之後結束。

35.如申請專利範圍第 20-29 項中任一項所述的用途，其中該醫藥品以每日兩次給藥，其中該第一醫療劑的劑量為 25 毫克至 200 毫克。

36.如申請專利範圍第 20-29 項中任一項所述的用途，其中該醫藥品以每日兩次給藥，其中該第一醫療劑的劑量為 50 毫克的劑量。

37.一種藥學組成物，其包含：

如申請專利範圍第 1-8 項中任一項所述的半酒石酸鹽；

至少一水溶性填充料；

至少一非水溶性填充料；

至少一黏結劑；以及

至少一潤滑劑。

38.如申請專利範圍第 37 項中所述的藥學組成物，其中該水溶性填充料選自無水乳糖、單水乳糖、甘露糖醇、氯化鈉、糖粉、山梨糖醇、蔗糖、肌醇以及預糊化（pregelatinized）澱粉所組成的群組。

39.如申請專利範圍第 37 項中所述的藥學組成物，其中該非水溶性填充料選自微晶纖維素、磷酸鈣以及澱粉所組成的群組。

40.如申請專利範圍第 37 項中所述的藥學組成物，其中該黏結劑選自預糊化澱粉、羧甲基纖維素鈉、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯四氫咯酮（polyvinyl

pyrrolidone)、乙烯基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物(copolyvidone)、明膠、天然膠、澱粉糊、蔗糖、玉米糖漿、聚乙二醇以及藻酸鈉所組成的群組。

41.如申請專利範圍第 37 項中所述的藥學組成物，其中該潤滑劑選自氫化蔬菜油、硬脂酸鈣以及甘油山嶺酸酯(glyceryl behenate)所組成的群組。

42.如申請專利範圍第 37 項中所述的藥學組成物，其中該水溶性填充料選自無水乳糖、單水乳糖、甘露糖醇、氯化鈉、糖粉、山梨糖醇、蔗糖、肌醇以及預糊化澱粉所組成的群組；該非水溶性填充料選自微晶纖維素、磷酸鈣以及澱粉所組成的群組；該黏結劑選自預糊化澱粉、羧甲基纖維素鈉、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯四氫咯酮、乙烯基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物、明膠、天然膠、澱粉糊、蔗糖、玉米糖漿、聚乙二醇以及藻酸鈉所組成的群組；以及該潤滑劑選自氫化蔬菜油、硬脂酸鈣以及甘油山嶺酸酯所組成的群組。

43.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 26 wt%至 50 wt%以乾固體為基礎的該水溶性填充料。

44.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 8 wt%至 32 wt%以乾固體為基礎的該非水溶性填充料。

45.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 8 wt%至 24 wt%以乾固體為基礎的該非水溶

性填充料。

46.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 12 wt%至 20 wt%以乾固體為基礎的該非水溶性填充料。

47.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 14 wt%至 18 wt%以乾固體為基礎的該非水溶性填充料。

48.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 2 wt%至 6 wt%以乾固體為基礎的該黏結劑。

49.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 0.1 wt%至 2 wt%以乾固體為基礎的該潤滑劑。

50.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 35 wt%至 40 wt%的該半酒石酸鹽、26 wt%至 50 wt%的該水溶性填充料；8 wt%至 32 wt%的該非水溶性填充料；2 wt%至 6 wt%的該黏結劑；以及 0.1 wt%至 2 wt%的該潤滑劑，全部均以乾固體為基礎。

51.如申請專利範圍第 42 項中所述的藥學組成物，其中該水溶性填充料是單水乳糖；該非水溶性填充料是微晶纖維素；該黏結劑是羥丙基甲基纖維素；以及該潤滑劑是甘油山嶺酸酯。

52.如申請專利範圍第 51 項中所述的藥學組成物，其中該組成物包含 35 wt%至 40 wt%的該半酒石酸鹽、26 wt%至 50 wt%的單水乳糖；8 wt%至 32 wt%的微晶纖維素；2 wt%

至 6 wt%的羥丙基甲基纖維素；以及 0.1 wt%至 2 wt%的甘油山嶺酸酯，全部均以乾固體為基礎。

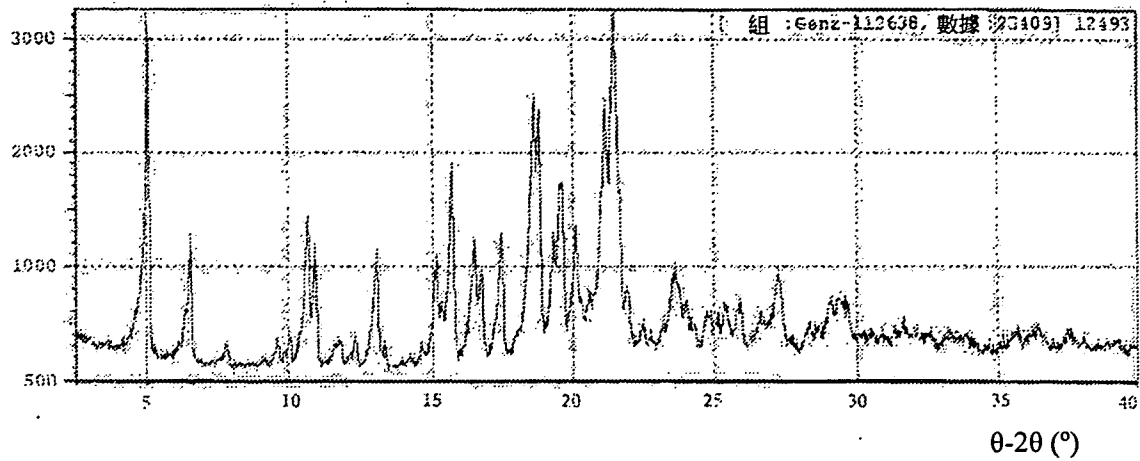
八、圖式：

(如次頁)

修正
105 年 9 月 14 日
補

公告本

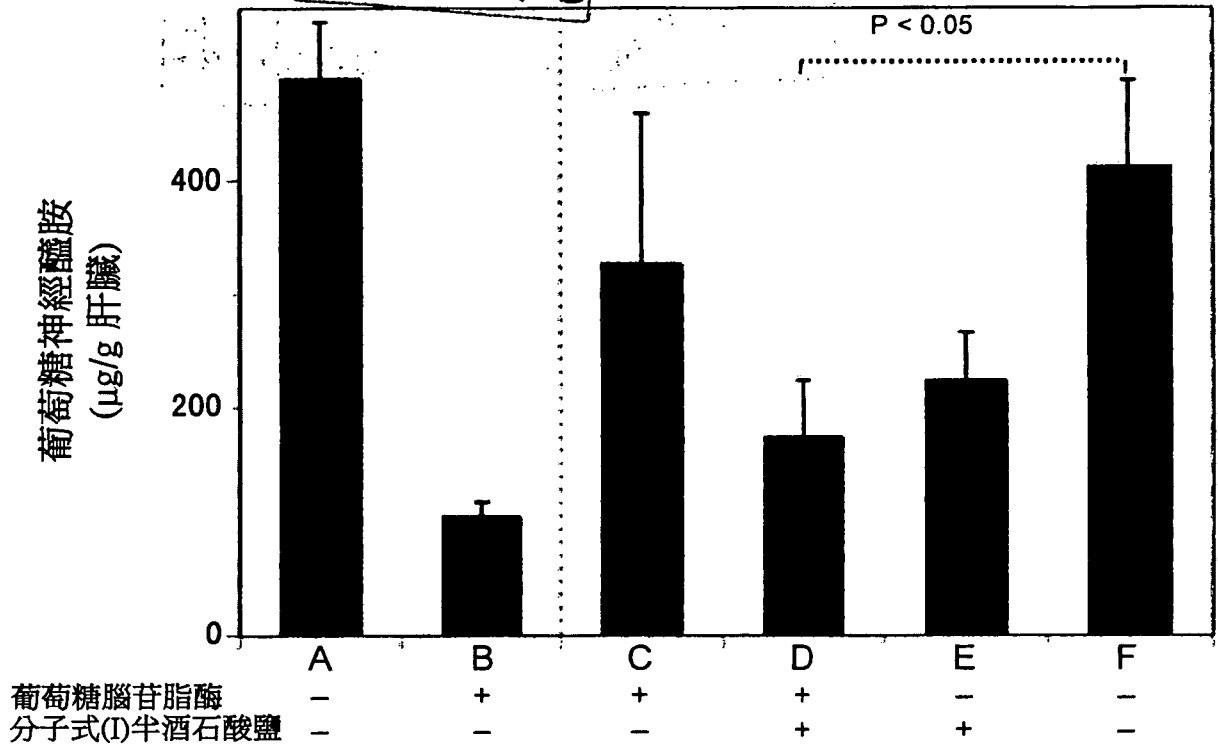
(SAD) I



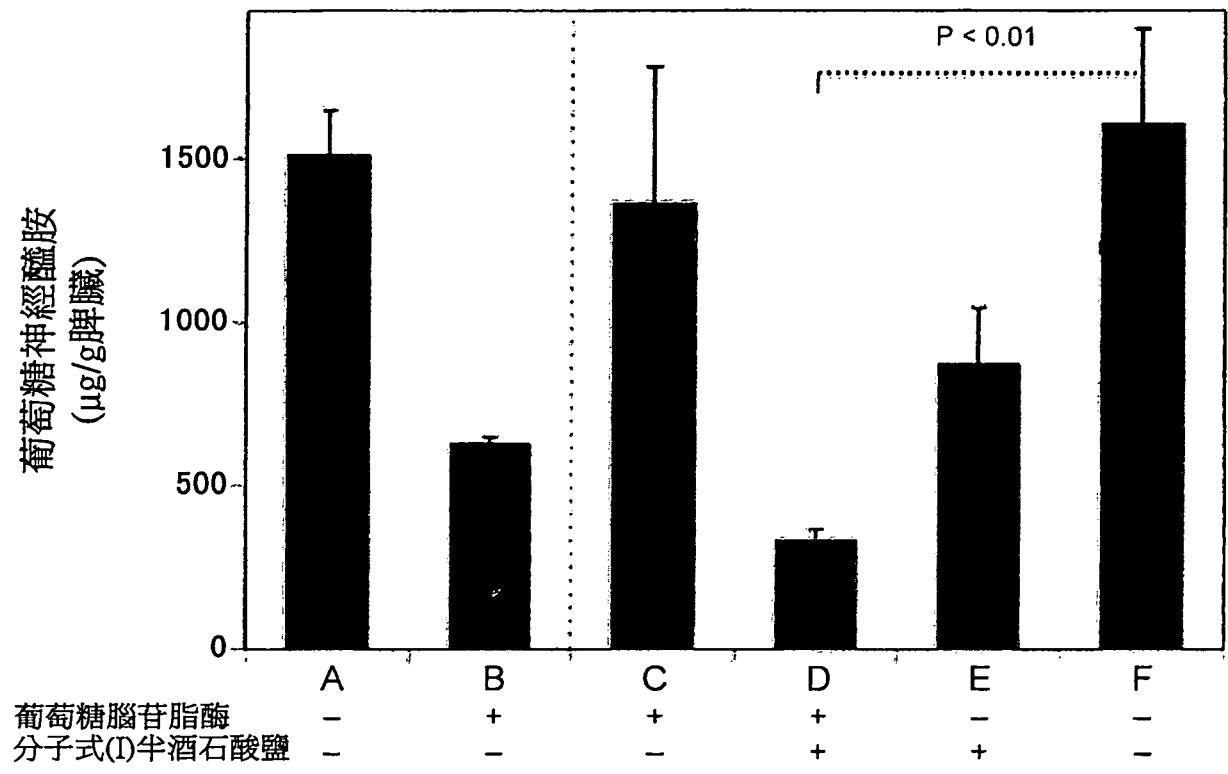
第 1 圖

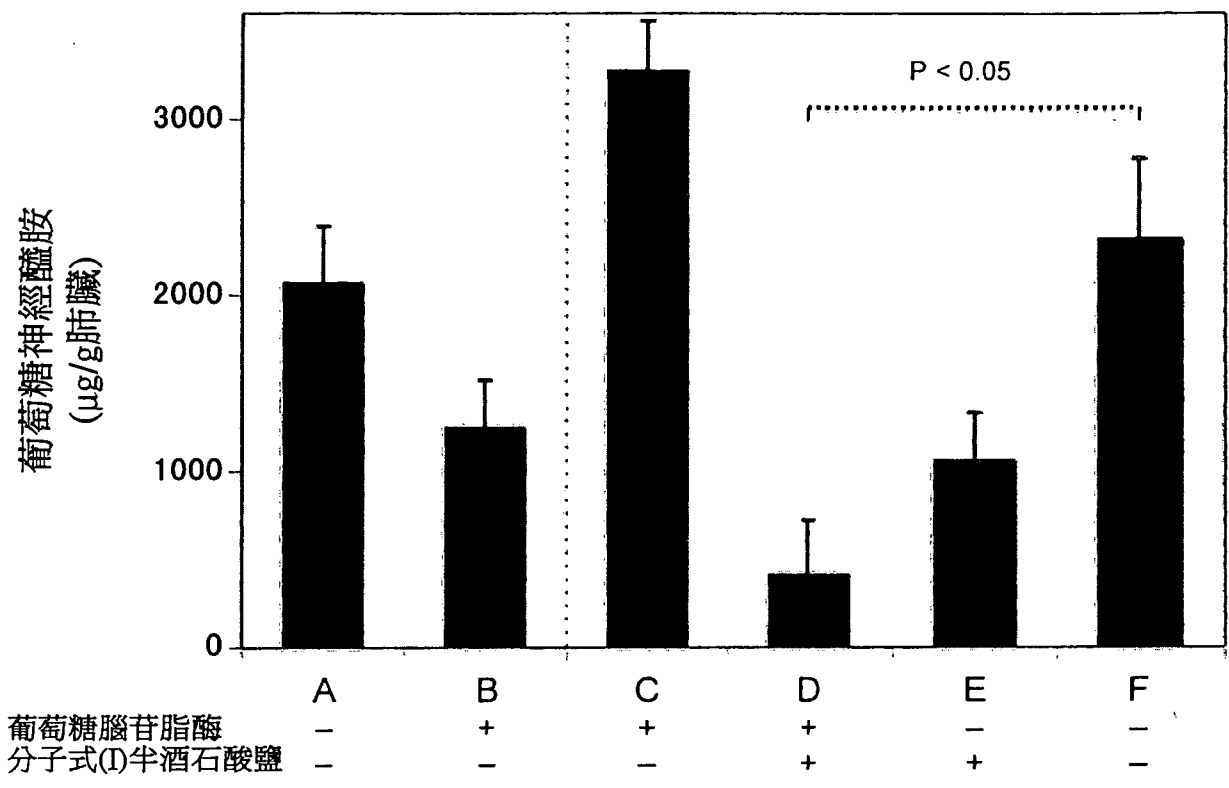
105年9月14日 修正
補充

105年9月14日替換頁

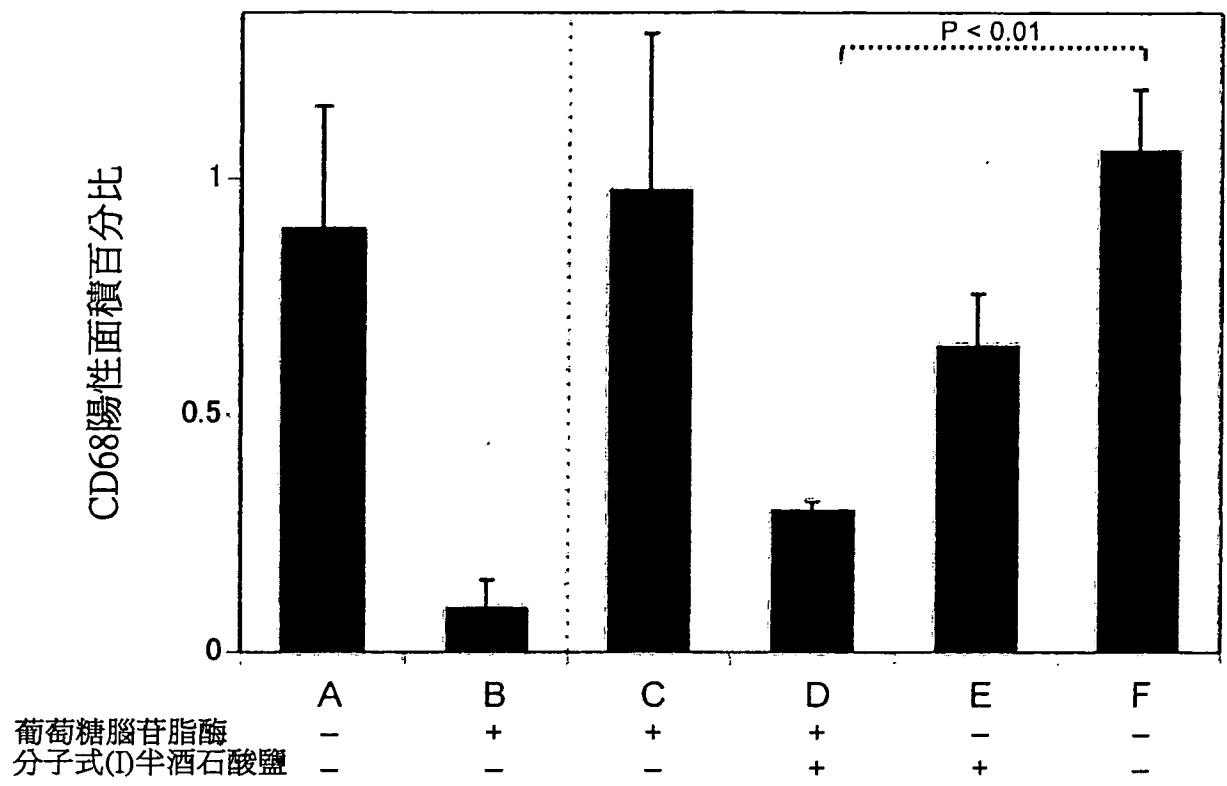


第2圖

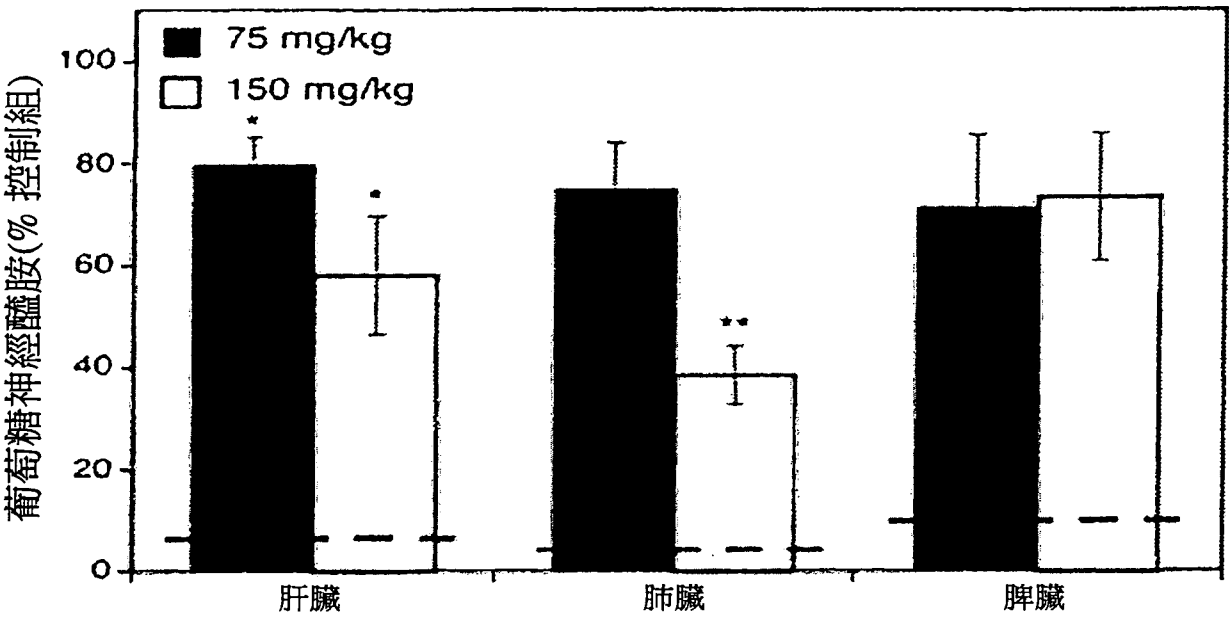




第4圖

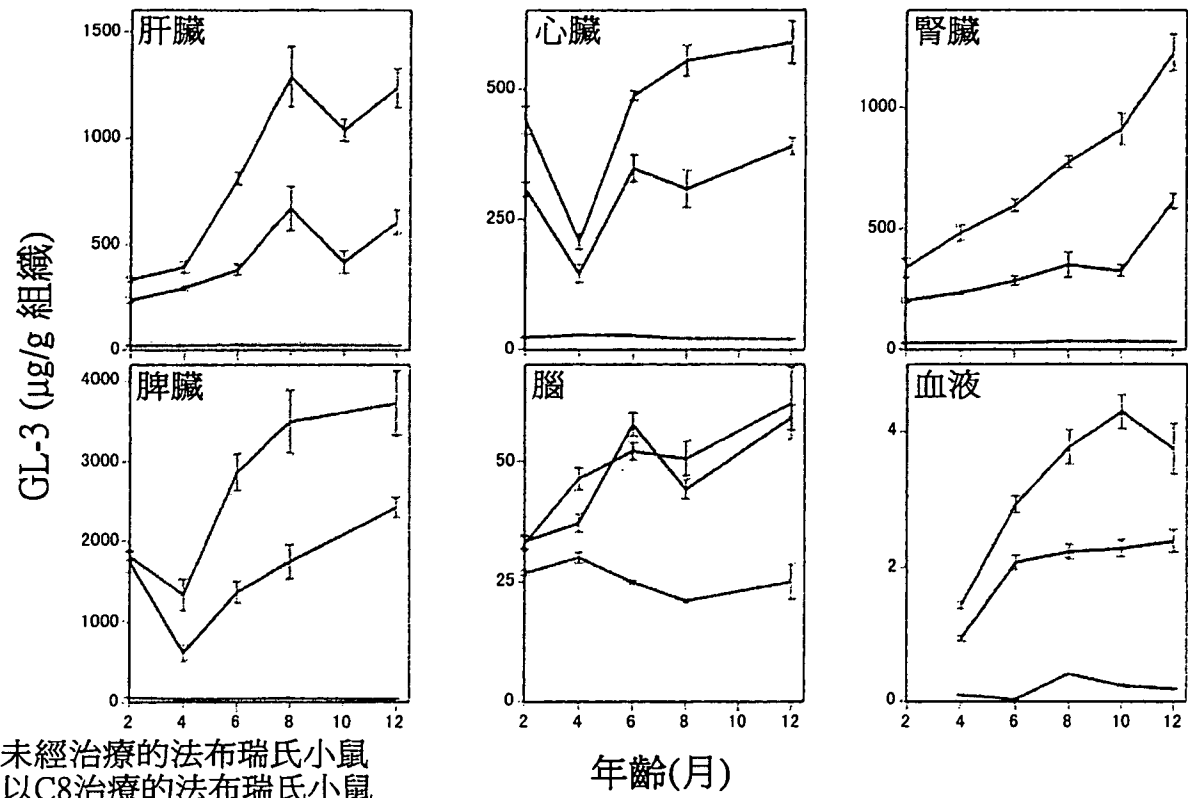


第5圖



第6圖

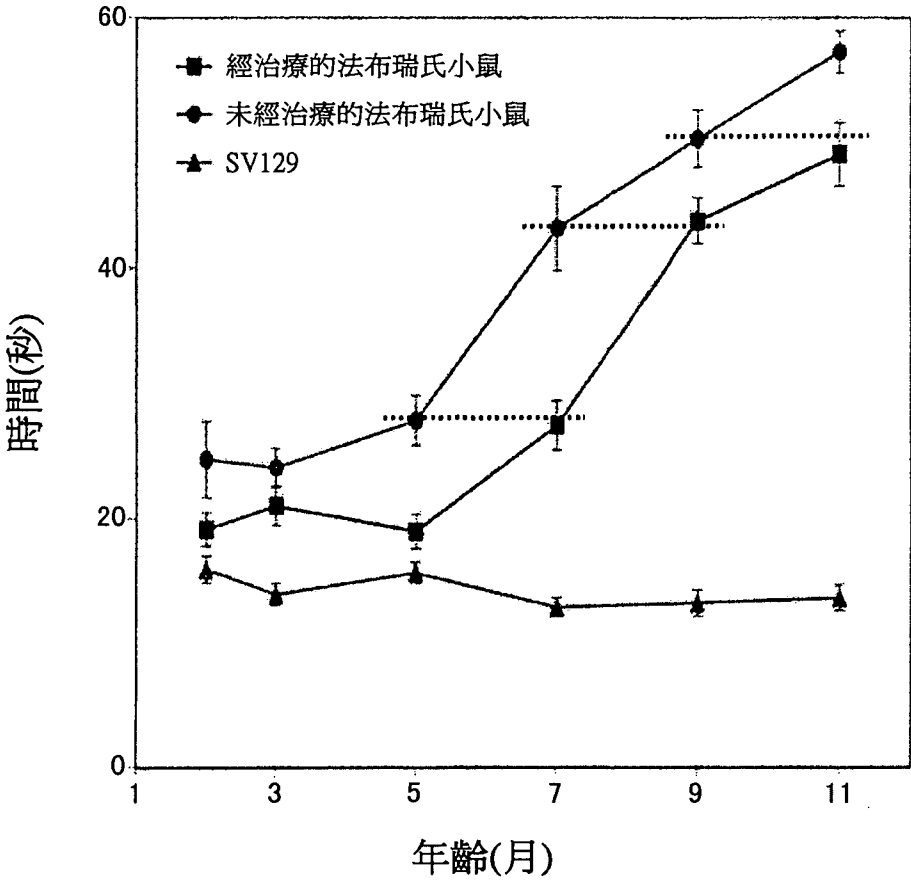
分子式(I)半酒石酸鹽抑制法布瑞氏
小鼠的GL-3累積程度



未經治療的法布瑞氏小鼠
以C8治療的法布瑞氏小鼠
野生型小鼠sv129

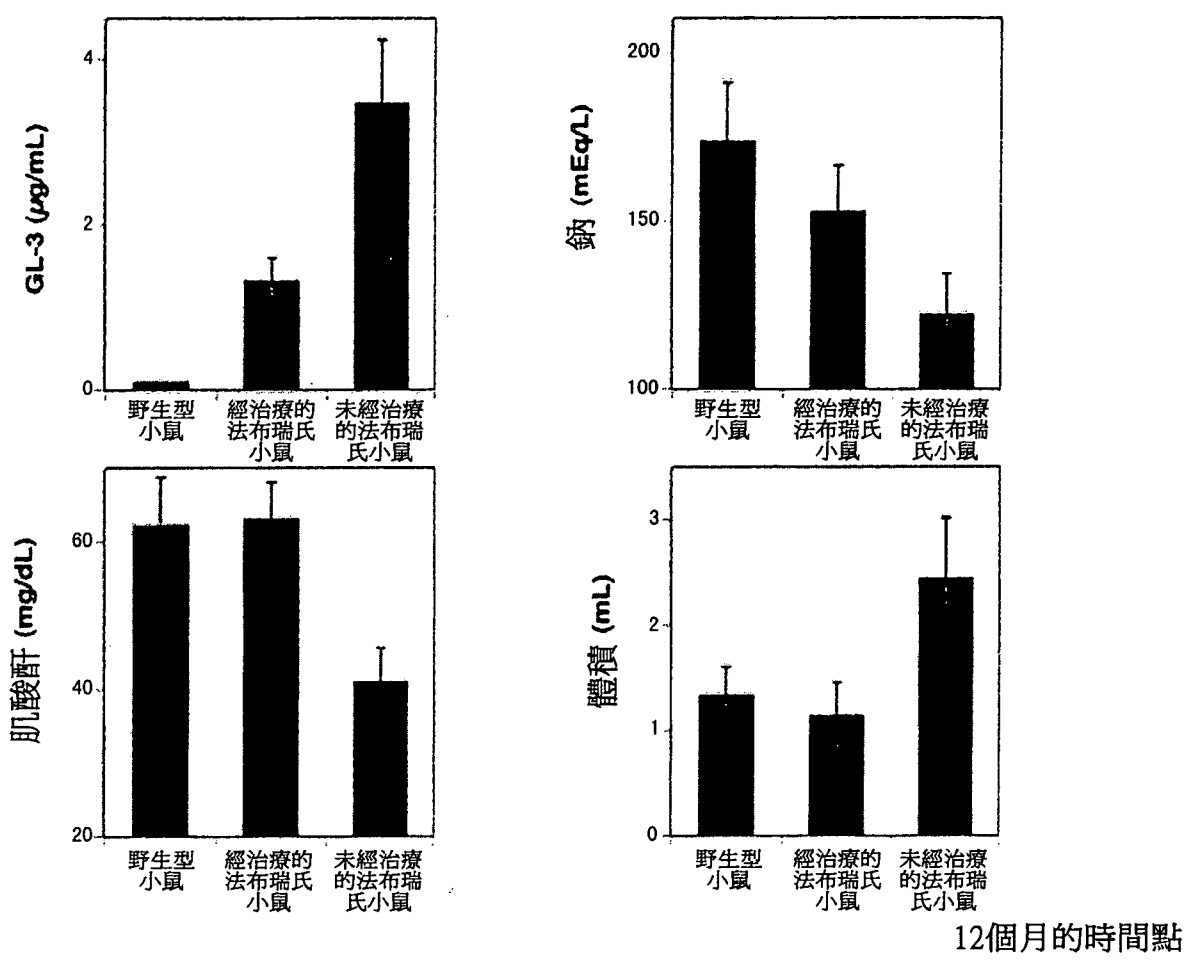
第7圖

分子式(I)半酒石酸鹽延遲法布瑞氏小鼠中
周邊神經病變之開始及發展



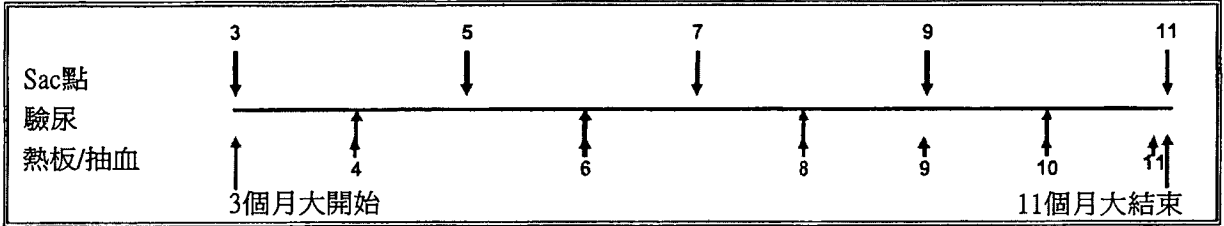
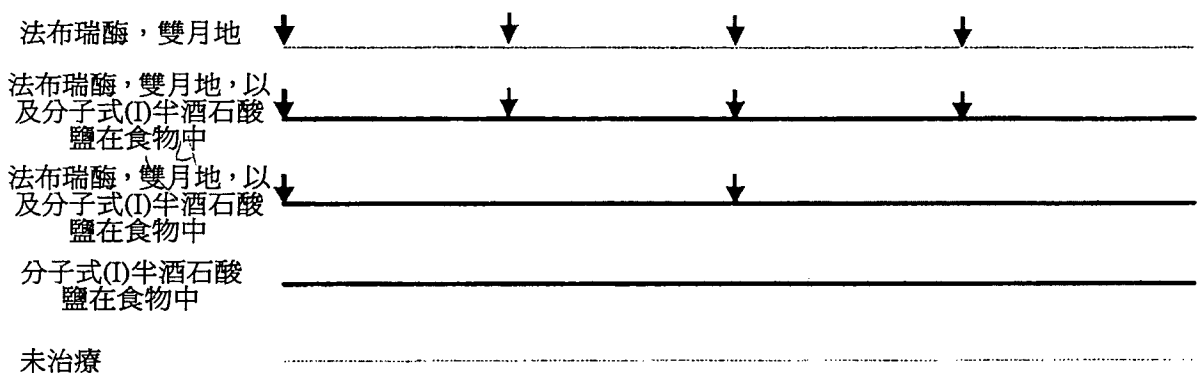
第8圖

以分子式(I)半酒石酸鹽治療法布瑞氏
小鼠改善腎臟功能的一些標記



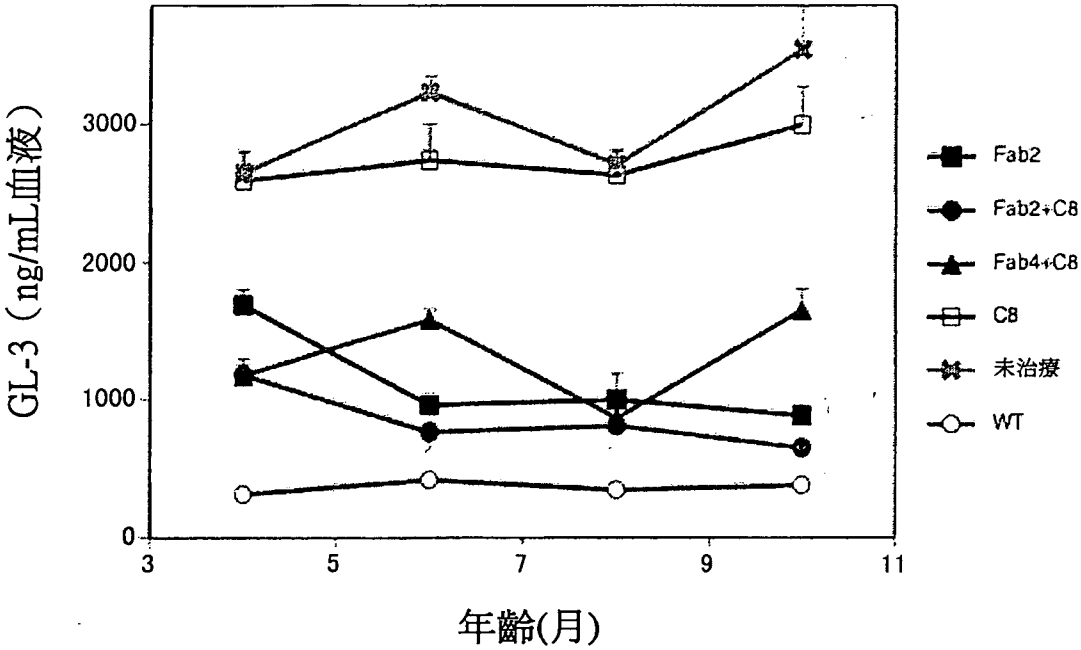
第9圖

法布瑞氏小鼠族群的ERT以及
SRT研究的時間進程



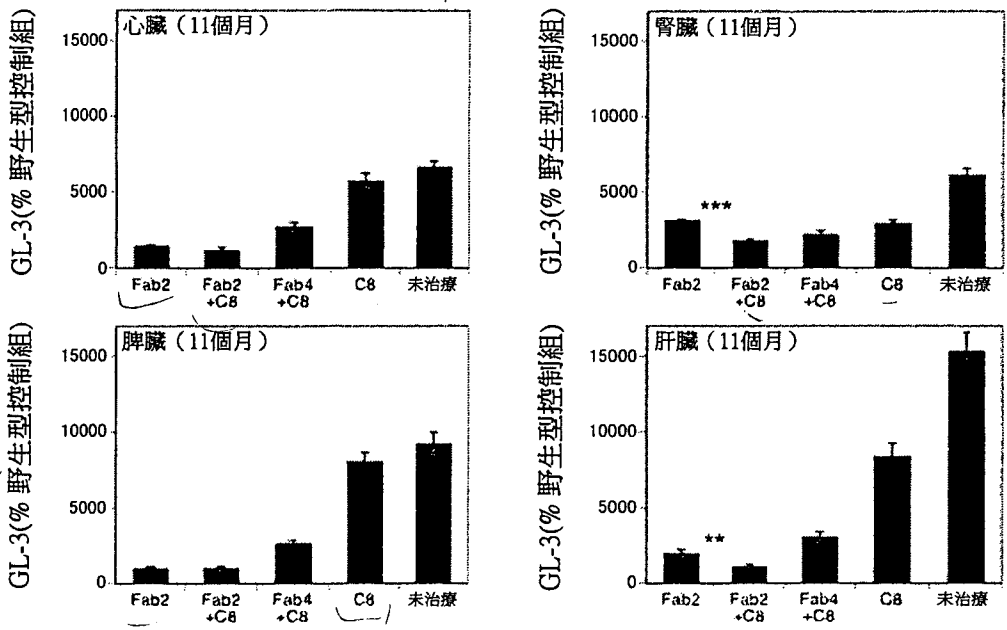
第10圖

ERT降低了法布瑞氏-Rag小鼠中的
血液GL-3量，而SRT則否



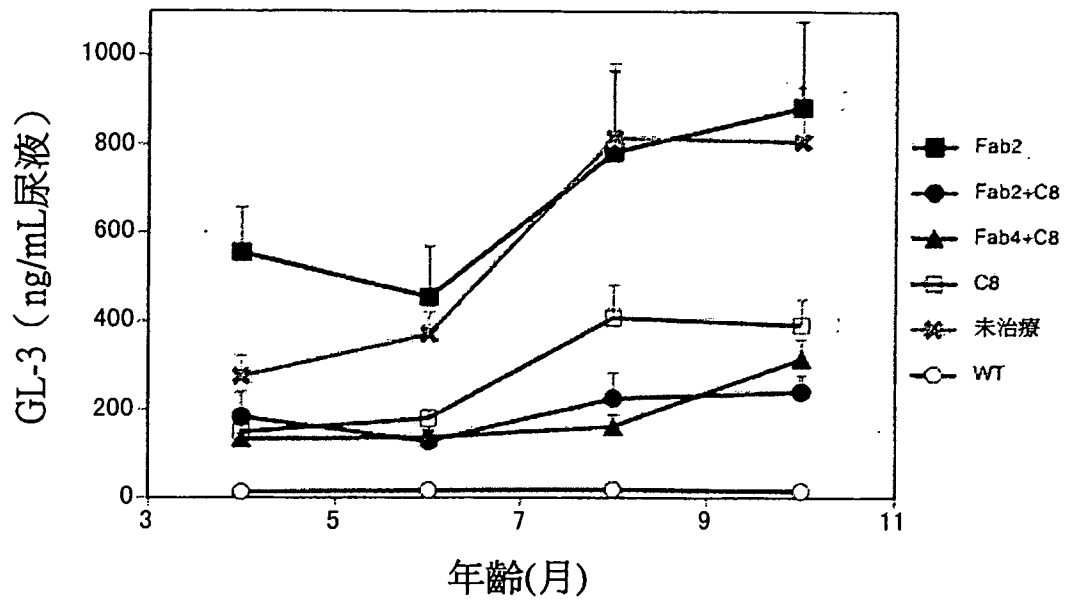
第11圖

合併ERT/SRT在降低法布瑞氏-Rag小鼠肝臟
以及腎臟中的GL-3量上是最有效的



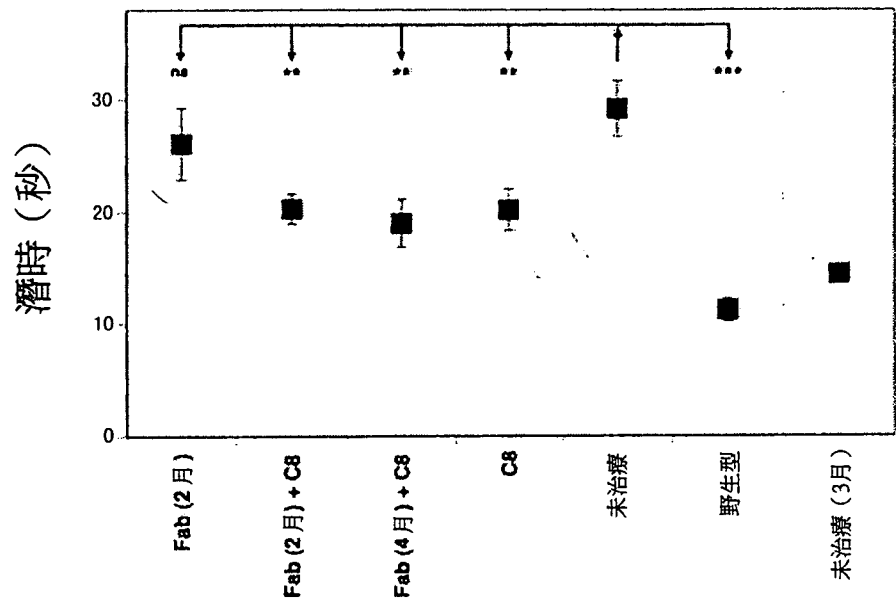
第12圖

SRT降低了法布瑞氏-Rag小鼠中的
的尿液GL-3量，而ERT則否

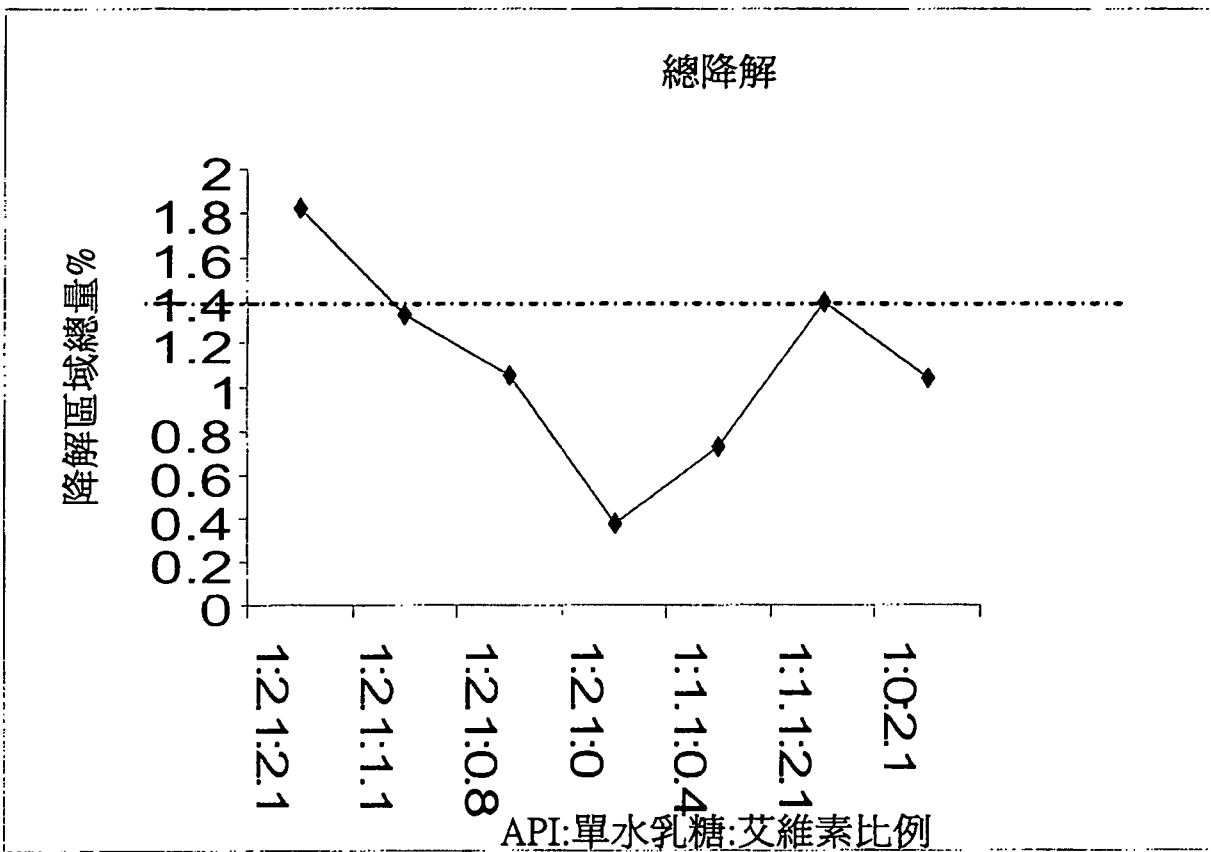


第13圖

SRT延遲了法布瑞氏小鼠(11個月)中
熱感覺遲鈍的開始，而非ERT



第14圖



第15圖