



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105753846 B

(45)授权公告日 2019.11.15

(21)申请号 201610218210.7

G·帕莱斯 J·佩特施密特

(22)申请日 2010.11.24

C·塞吉尔 程僧

(65)同一申请的已公布的文献号

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

申请公布号 CN 105753846 A

11256

(43)申请公布日 2016.07.13

代理人 陈文平 黄海波

(30)优先权数据

(51)Int.Cl.

61/264,748 2009.11.27 US

C07D 405/06(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61K 31/4025(2006.01)

201080061535.X 2010.11.24

A61P 35/00(2006.01)

(73)专利权人 基酶有限公司

(56)对比文件

地址 美国马萨诸塞州

Timothy M. Cox等.Medicinal use of iminosugars.《Iminosugars:From Synthesis to Therapeutic》.2008,第295-326页.

(72)发明人 刘汉兰 C·威利斯

STN.928659-70-5.《STN-Registry》.2007,

R·布哈德瓦杰 D·P·科佩兰德

审查员 严彤

A·哈里亚纳瓦拉 J·斯科尔

权利要求书2页 说明书40页 附图11页

J·马绍尔 J·科克林

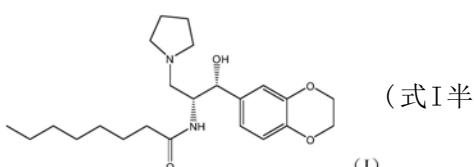
## (54)发明名称

作为葡糖神经酰胺合酶的抑制剂的无定型和结晶形式的Genz 112638半酒石酸盐

## (57)摘要

公开了由以下结构式代表的化合物的半酒

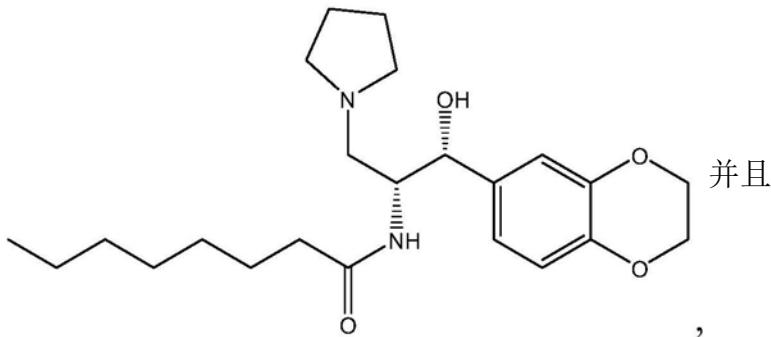
石酸盐：



酒石酸盐),其可用于药学应用。式(I)半酒石酸盐的特定单晶型的特征在于多种性质和物理测量。此外也公开了制备结晶的式(I)半酒石酸盐的方法、以及用它抑制受试者的葡糖神经酰胺合酶或降低受试者的鞘糖脂浓度,从而治疗多种疾病。也描述了药物组合物。

1. 第一治疗剂联合有效量的能有效治疗戈谢病的第二治疗剂在制备用于治疗戈谢病的药物中的用途，

其中所述第一治疗剂是由以下结构式代表的化合物或其药学可接受的盐：



其中所述第二治疗剂是葡糖脑苷脂酶、葡糖脑苷脂酶类似物。

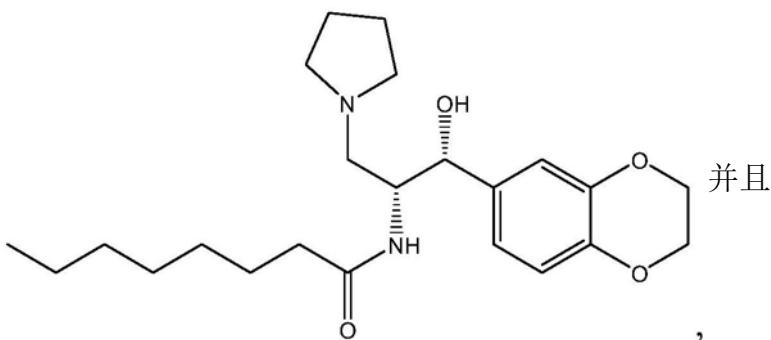
2. 如权利要求1所述的用途，其中所述第二治疗剂是伊米昔酶。

3. 如权利要求1所述的用途，其中所述第二治疗剂是taliglucerase。

4. 如权利要求1所述的用途，其中所述第二治疗剂是velaglucerase。

5. 第一治疗剂联合有效量的能有效治疗法布里病的第二治疗剂在制备用于治疗法布里病的药物中的用途，

其中所述第一治疗剂是以下结构式代表的化合物或其药学可接受的盐：



其中所述第二治疗剂是α半乳糖苷酶A、或α半乳糖苷酶A类似物。

6. 如权利要求5所述的用途，其中所述第二治疗剂是半乳糖苷酶β。

7. 如权利要求5所述的用途，其中所述第二治疗剂是半乳糖苷酶α。

8. 如权利要求1-7任一项所述的用途，其中给予的所述药物中的所述第一治疗剂是半酒石酸盐。

9. 如权利要求1-7任一项所述的用途，其中给予的所述药物中的所述第一治疗剂是晶体形式的半酒石酸盐。

10. 如权利要求1-7任一项所述的用途，其中所述第一治疗剂以单晶型的半酒石酸盐给药，所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处的主要x-射线粉末衍射峰。

11. 如权利要求1-7任一项所述的用途，其中所述第一治疗剂以单晶型的半酒石酸盐给药，所述单晶型的特征在于2θ角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°和23.5°处的x-射线粉末衍射峰。

12. 如权利要求1-11任一项所述的用途，其中所述药物提供第一治疗剂的每日两次的

剂量,每剂量为25毫克到200毫克。

13.如权利要求1-11任一项所述的用途,其中所述药物提供第一治疗剂的每日两次的剂量,每剂量为50毫克。

## 作为葡糖神经酰胺合酶的抑制剂的无定型和结晶形式的Genz 112638半酒石酸盐

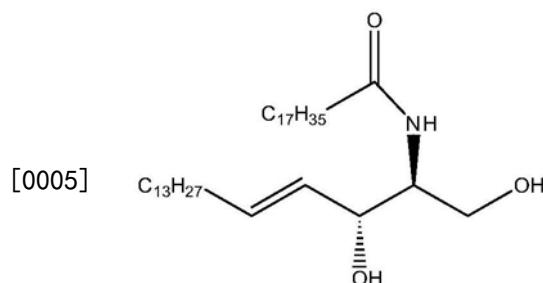
[0001] 本申请是申请日为2010年11月24日、申请号为 201080061535.X、发明名称为“作为葡糖神经酰胺合酶的抑制剂的无定型和结晶形式的Genz 112638半酒石酸盐”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2009年11月27日提交的美国临时申请no.61/264,748 的优先权,其全部教导合并于此。

### 背景技术

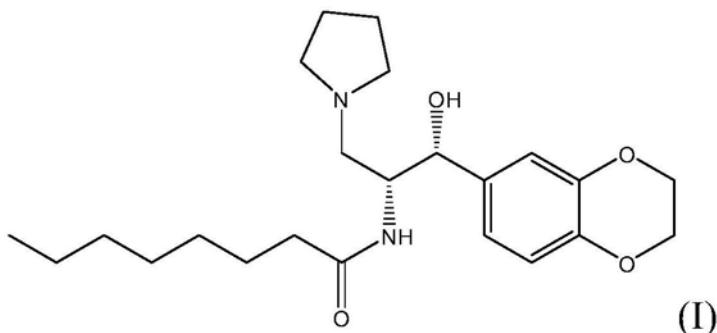
[0004] 鞘糖脂 (GSL) 是一类天然存在的化合物,其具有众多生物功能,包括促进细胞生长、细胞分化、细胞之间或细胞与基质蛋白之间的粘附、微生物和病毒与细胞的结合、以及肿瘤细胞转移的能力。GSL衍生自葡糖神经酰胺 (GlcCer) ,其由神经酰胺和UDP-葡萄糖通过酶UDP-葡萄糖: N-酰基鞘氨醇葡萄糖基转移酶 (GlcCer合酶) 产生。神经酰胺的结构显示如下:



[0006] GSL的积聚与许多疾病有关,包括Tay-Sachs病、戈谢病和法布里病(例如参见美国专利No.6,051,598)。GSL也与某些癌症有关。例如,已经发现某些GSL仅存在于肿瘤中或以异常高的浓度存在于肿瘤中;当添加至培养基中的肿瘤细胞时对肿瘤生长发挥显著的刺激或抑制作用;以及当通过肿瘤脱落入周围胞外液中时抑制机体的正常免疫防御体系。当肿瘤变得日益恶性时肿瘤的GSL成分发生变化,且某些GSL的抗体抑制肿瘤生长。

[0007] 抑制GlcCer合酶的化合物可以降低GSL浓度,并已报导能用于治疗患有上述疾病之一的受试者。许多有效的GlcCer抑制剂(此处称为“氨基神经酰胺样化合物”)在美国专利Nos.6,051,598、5,952,370、5,945,442、5,916,911和6,030,995中公开。显示如下的式 (I) 化合物是目前在临床试验中用于治疗戈谢病的GlcCer合酶抑制剂:

[0008]



[0009] 需要结晶的且具有适于大规模制备的物理性质的该药物候选者的盐形式。也需要其中该药物候选者是稳定的且有效递送至患者的药物制剂,以及采用该化合物的改善的治疗方法。

[0010] 发明简述

[0011] 已经发现式(I)化合物的半酒石酸盐(以下称为“式(I)半酒石酸盐”)可以在良好定义的条件下结晶从而提供某种非吸湿性的晶型。当与式(I)的其他盐相比较时,式(I)半酒石酸盐具有若干有利性质。如进一步在实施例1中所描述,许多式(I)盐,包括柠檬酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、甲基磺酸盐和醋酸盐,不能以固体形式获得。尽管能以固体形式获得式(I)的盐酸盐和1:1酒石酸盐,两者都不是结晶的,且对于制剂而言吸湿性太强。式(I)半酒石酸盐比游离碱和其他盐更容易配制和合成。式(I)半酒石酸盐也是结晶的、非吸湿性的、水溶性的且流动性好于相应游离碱(以下称为式(I)游离碱”)和其他盐。因此,这些有利性质使得式(I)半酒石酸盐作为药物候选者适于大规模制备。

[0012] 也发现用于式(I)半酒石酸盐的胶囊制剂的稳定颗粒可采用规定比例的水不溶性填充剂、水溶性填充剂和式(I)半酒石酸盐来制备。基于该新发现,公开了式(I)半酒石酸盐的稳定的药物制剂。

[0013] 也发现式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括式(I)半酒石酸盐)通过肝脏、主要通过细胞色素P450酶来代谢。基于该新发现,公开了用降低药物/药物相互作用的可能性的式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括式(I)半酒石酸盐)来进行治疗的方法。

[0014] 也发现与用单独的葡萄糖脑苷脂酶或者单独的式(I)半酒石酸盐治疗相比较,戈谢小鼠给药重组葡萄糖脑苷脂酶然后给药式(I)半酒石酸盐显示内脏器官中较低的GL1水平和肝中戈谢细胞数目减少。基于该新发现,公开了与式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括式(I)半酒石酸盐)的联合治疗。

[0015] 本申请的一个实施方式是由式(I)代表的化合物的半酒石酸盐。如上所述,由式(I)代表的化合物的半酒石酸盐在本发明中称为“式(I)半酒石酸盐”。由式(I)代表的化合物在本发明中称为“式(I)游离碱”。

[0016] 本申请的另一个实施方式提供含有药学可接受的载体或稀释剂和式(I)半酒石酸盐的药物组合物。

[0017] 另一个实施方式提供通过将有效量的式(I)半酒石酸盐给予需要治疗的受试者来抑制受试者的葡萄糖神经酰胺合酶或降低受试者的鞘糖脂浓度的方法。

[0018] 另一个实施方式提供式(I)半酒石酸盐在制备用于抑制需要治疗的受试者的葡萄糖神经酰胺合酶或降低需要治疗的受试者的鞘糖脂浓度的药剂的用途。

[0019] 另一个实施方式提供式(I)半酒石酸盐用于抑制需要治疗的受试者的葡萄糖神经酰

胺合酶或降低需要治疗的受试者的鞘糖脂浓度的用途。

[0020] 另一个实施方式是治疗患有戈谢病的受试者的方法。所述方法包括将有效量的第一治疗剂与有效量的第二治疗剂联合给予受试者。所述第一治疗剂由式(I)代表或是其药学可接受的盐；和所述第二治疗剂能有效治疗戈谢病。

[0021] 另一个实施方式是治疗患有法布里病的受试者的方法。所述方法包括将有效量的第一治疗剂与有效量的第二治疗剂联合给予受试者。所述第一治疗剂由式(I)代表或是其药学可接受的盐；和所述第二治疗剂能有效治疗法布里病。

[0022] 另一个实施方式提供药物组合物，其含有：由式(I)代表的化合物的半酒石酸盐；至少一种水溶性填充剂；至少一种水不溶性填充剂；至少一种粘合剂；和至少一种润滑剂。

[0023] 本发明的另一个实施方式是治疗患有法布里病的受试者的方法。所述方法包括以下步骤：

[0024] a) 将有效量的式(I)化合物或其药学可接受的盐给予受试者；

[0025] b) 测试受试者以确定所述受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型(poor, intermediate or extensive/ultra rapid P450 metabolizer)；

[0026] c) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，

[0027] 确定化合物的调整有效量；以及

[0028] d) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，将调整有效量的式(I)化合物给予受试者，和如果受试者是P450贫乏代谢型，将有效量的式(I)化合物给予受试者。

[0029] 本发明的另一个实施方式是治疗患有戈谢病的受试者的方法。所述方法包括以下步骤：

[0030] a) 将有效量的式(I)化合物或其药学可接受的盐给予受试者；

[0031] b) 测试受试者以确定所述受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型；

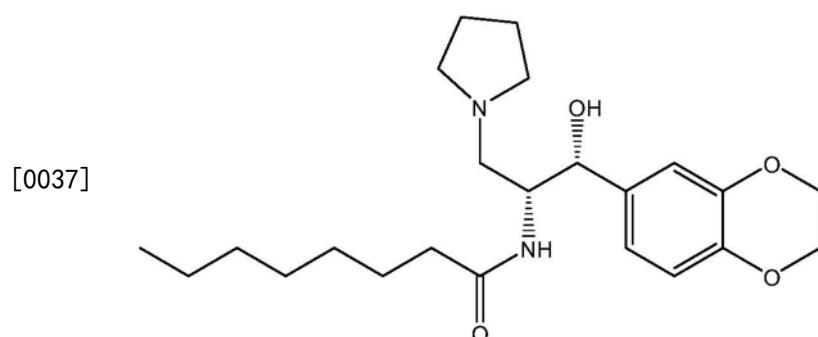
[0032] c) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，

[0033] 确定化合物的调整有效量；以及

[0034] d) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，将调整有效量的式(I)化合物给予受试者，和如果受试者是P450贫乏代谢型，将有效量的式(I)化合物给予受试者。

[0035] 本发明的另一个实施方式是治疗患有法布里病的受试者。所述方法包括以下步骤：

[0036] a) 将有效量的由以下结构式代表的化合物或其药学可接受的盐给予受试者：



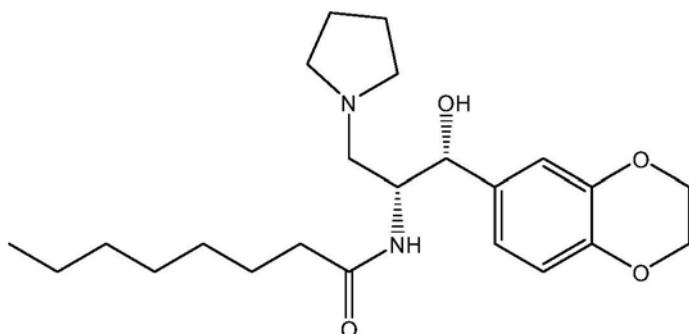
[0038] b) 评估受试者的化合物的谷血浆水平;和

[0039] c) 调整给予受试者的化合物的量,以使化合物的谷血浆水平为至少 5ng/ml。或者,在步骤b) 中评估受试者的化合物的谷血浆水平和C<sub>max</sub>且在步骤c) 中调整给予受试者的化合物的量,以使受试者的化合物的谷血浆水平为至少5ng/ml且受试者的C<sub>max</sub>低于100ng/ml。

[0040] 本发明的另一个实施方式是治疗患有戈谢病的受试者。所述方法包括以下步骤:

[0041] a) 将有效量的由以下结构式代表的化合物或其药学可接受的盐给予受试者:

[0042]



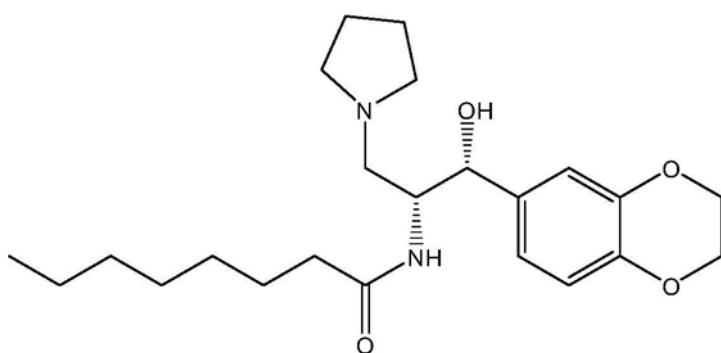
[0043] b) 评估受试者的化合物的谷血浆水平;和

[0044] c) 调整给予受试者的化合物的量,以使受试者的化合物的谷血浆水平为至少5ng/ml。或者,在步骤b) 中评估受试者的化合物的谷血浆水平和C<sub>max</sub>且在步骤c) 中调整给予受试者的化合物的量,以使受试者的化合物的谷血浆水平为至少5ng/ml且受试者的C<sub>max</sub>低于100ng/ml。

[0045] 在另一个方面,本申请还包含以下项目1-93。

[0046] 1、由以下结构式代表的化合物的半酒石酸盐:

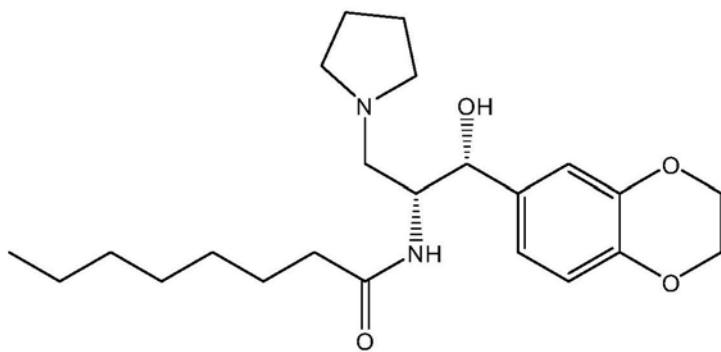
[0047]



[0048] 其中所述盐是无定形盐。

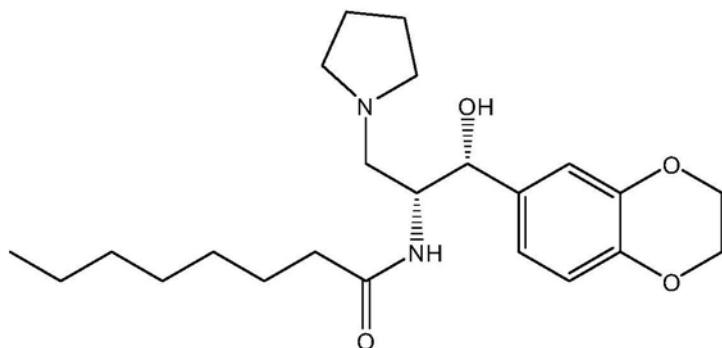
[0049] 2、由以下结构式代表的化合物的半酒石酸盐:

[0050]



- [0051] 其中至少70重量%的所述盐是晶体。
- [0052] 3、由以下结构式代表的化合物的半酒石酸盐：

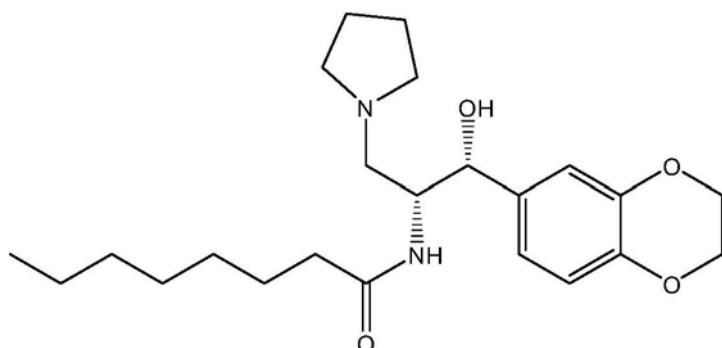
[0053]



- [0054] 其中至少70重量%的所述盐是单晶型。

- [0055] 4、由以下结构式代表的化合物的半酒石酸盐：

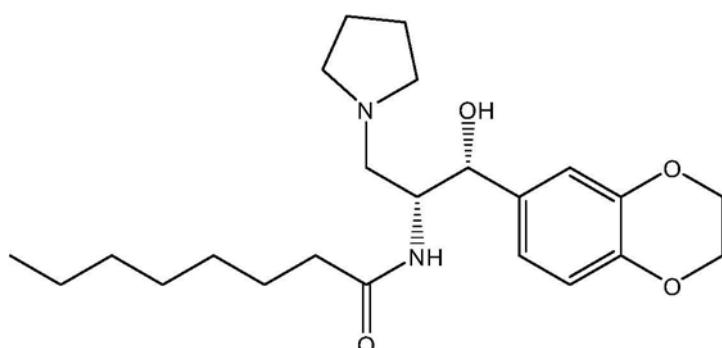
[0056]



- [0057] 其中至少99重量%的所述盐是晶体。

- [0058] 5、由以下结构式代表的化合物的半酒石酸盐：

[0059]



- [0060] 其中至少99重量%的所述盐是单晶型。

- [0061] 6、如项目1-5任一项所述的半酒石酸盐,其中所述半酒石酸盐选自 D-半酒石酸盐、L-半酒石酸盐、内消旋半酒石酸或外消旋D,L-半酒石酸盐。

- [0062] 7、如项目1-5任一项所述的半酒石酸盐,其中所述半酒石酸盐是 L-半酒石酸盐。

- [0063] 8、如项目3或5所述的盐,其中至少70重量%的所述盐是单晶型 A型。

- [0064] 9、如项目3或5所述的盐,其中所述单晶型的特征在于20角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处至少一个主要x-射线粉末衍射峰。

- [0065] 10、如项目3或5所述的盐,其中所述单晶型的特征在于20角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处至少两个主要x-射线粉末衍射峰。

- [0066] 11、如项目3或5所述的盐,其中所述单晶型的特征在于20角5.1°、6.6°、10.7°、

11.0°、15.9°和21.7°处至少三个主要x-射线粉末衍射峰。

[0067] 12、如项目3或5所述的盐,其中所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处至少四个主要x-射线粉末衍射峰。

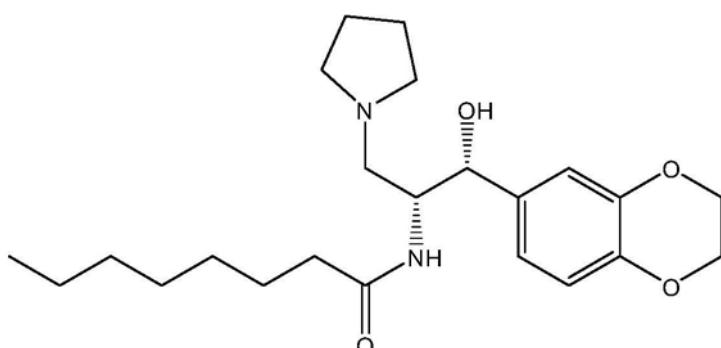
[0068] 13、如项目3或5所述的盐,其中所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处的主要x-射线粉末衍射峰。

[0069] 14、如项目3或5所述的盐,其中所述单晶型的特征在于2θ角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°和23.5°处的x-射线粉末衍射峰。

[0070] 15、如项目3或5所述的盐,其中所述单晶型的特征在于图1的x-射线粉末衍射图。

[0071] 16、一种药物组合物,含有由以下结构式代表的化合物的半酒石酸盐:

[0072]



[0073] 和药学可接受的载体或稀释剂。

[0074] 17、如项目16所述的药物组合物,其中所述盐是无定形盐。

[0075] 18、如项目16所述的药物组合物,其中至少70重量%的所述盐是晶体。

[0076] 19、如项目16所述的药物组合物,其中至少70重量%的所述盐是单晶型。

[0077] 20、如项目16所述的药物组合物,其中至少99重量%的所述盐是晶体。

[0078] 21、如项目16所述的药物组合物,其中至少99重量%的所述盐是单晶型。

[0079] 22、如项目16所述的药物组合物,其中所述半酒石酸盐选自D-半酒石酸盐、L-半酒石酸盐、内消旋半酒石酸或外消旋D,L-半酒石酸盐。

[0080] 23、如项目16所述的药物组合物,其中所述半酒石酸盐是L-半酒石酸盐。

[0081] 24、如项目19或21所述的药物组合物,其中至少70重量%的所述盐是单晶型A型。

[0082] 25、如项目19或21所述的药物组合物,其中所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处至少一个主要x-射线粉末衍射峰。

[0083] 26、如项目19或21所述的药物组合物,其中所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处至少两个主要x-射线粉末衍射峰。

[0084] 27、如项目19或21所述的药物组合物,其中所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处至少三个主要x-射线粉末衍射峰。

[0085] 28、如项目19或21所述的药物组合物,其中所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处至少四个主要x-射线粉末衍射峰。

[0086] 29、如项目19或21所述的药物组合物,其中所述单晶型的特征在于2θ角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处的主要x-射线粉末衍射峰。

[0087] 30、如项目19或21所述的药物组合物,其中所述单晶型的特征在于2θ角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°和23.5°处的x-射线粉末衍射峰。

[0088] 31、如项目19或21所述的药物组合物,其中所述单晶型的特征在于图1的x-射线粉末衍射图。

[0089] 32、治疗患有戈谢病的受试者的方法,包括将有效量的如项目1-15 任一项所述的半酒石酸盐给予所述受试者。

[0090] 33、治疗患有法布里病的受试者的方法,包括将有效量的如项目 1-15任一项所述的半酒石酸盐给予所述受试者。

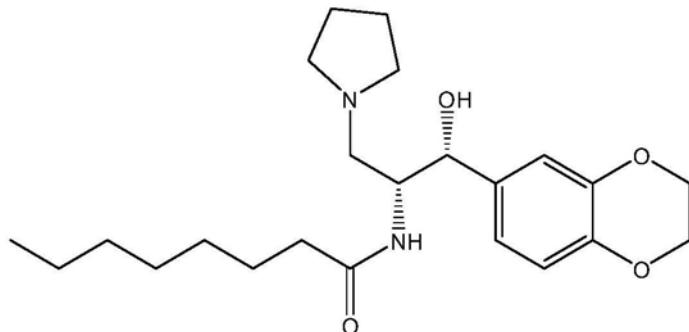
[0091] 34、通过将有效量的如项目1-15任一项所述的半酒石酸盐给予受试者来抑制需要治疗的受试者的葡萄糖神经酰胺合酶或降低需要治疗的受试者的鞘糖脂浓度的方法。

[0092] 35、如项目32、33或34所述的方法,包括每日两次给予25毫克到 200毫克剂量的半酒石酸盐。

[0093] 36、如项目32、33或34所述的方法,包括每日两次给予50毫克剂量的半酒石酸盐。

[0094] 37、治疗患有戈谢病的受试者的方法,包括将有效量的由以下结构式代表的第一化合物或其药学可接受的盐:

[0095]



[0096] 和有效量的能有效治疗戈谢病的第二治疗剂联合给药于受试者。

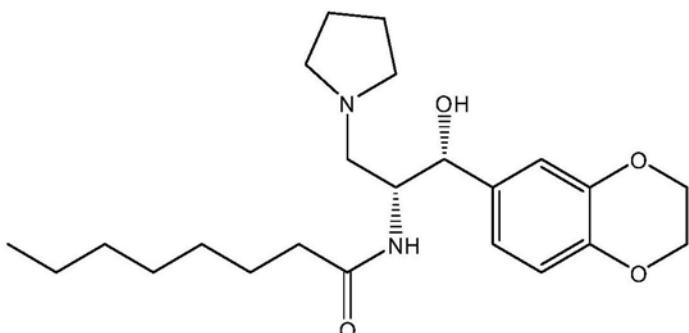
[0097] 38、如项目37所述的方法,其中所述第二治疗剂是伊米昔酶。

[0098] 39、如项目37所述的方法,其中所述第二治疗剂是isofagomine。

[0099] 40、如项目37所述的方法,其中所述第二治疗剂是miglustat。

[0100] 41、治疗患有法布里病的受试者的方法,所述方法包括将有效量的由以下结构式代表的第一治疗剂或其药学可接受的盐:

[0101]



[0102] 和有效量的能有效治疗法布里病的第二治疗剂联合给药于受试者。

[0103] 42、如项目41所述的方法,其中所述第二治疗剂是migalastat。

[0104] 43、如项目41所述的方法,其中所述第二治疗剂是半乳糖苷酶β。

[0105] 44、如项目37-43任一项所述的方法,其中所述第一治疗剂以如项目1-5任一项所述的半酒石酸盐给予。

[0106] 45、如项目37-43任一项所述的方法,其中在用所述第二治疗剂治疗至少十周期间后开始用所述第一治疗剂治疗。

[0107] 46、如项目37-43任一项所述的方法,其中在用所述第二治疗剂治疗后开始用所述第一治疗剂治疗,且其中在受试者的血小板计数等于或大于100,000mm<sup>3</sup>;血红蛋白浓度等于或大于11g/dl(女性)或12g/dl(男性);和/或受试者的脾体积小于或等于正常体积的10倍和肝体积小于或等于正常体积的1.5倍后开始用所述第一治疗剂治疗。

[0108] 47、如项目45或46所述的方法,其中在用所述第一治疗剂治疗开始后结束用所述第二治疗剂的治疗。

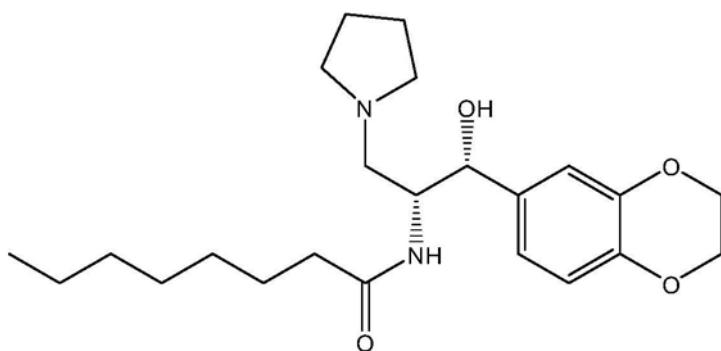
[0109] 48、如项目37-47任一项所述的方法,包括每日两次给予25毫克到 200毫克剂量的第一治疗剂。

[0110] 49、如项目37-47任一项所述的方法,包括每日两次给予50毫克剂量的第一治疗剂。

[0111] 50、一种药物组合物,包含:

[0112] 由以下结构式代表的化合物的半酒石酸盐:

[0113]



[0114] 至少一种水溶性填充剂;

[0115] 至少一种水不溶性填充剂;

[0116] 至少一种粘合剂;和

[0117] 至少一种润滑剂。

[0118] 51、如项目50所述的药物组合物,其中所述半酒石酸盐是如项目 1-15任一项所述的半酒石酸盐。

[0119] 52、如项目50所述的药物组合物,其中所述水溶性填充剂选自下组:无水乳糖、乳糖一水合物、甘露醇、氯化钠、糖粉、山梨醇、蔗糖、肌醇和预胶化淀粉。

[0120] 53、如项目50所述的药物组合物,其中所述水不溶性填充剂选自下组:微晶纤维素、磷酸钙和淀粉。

[0121] 54、如项目50所述的药物组合物,其中所述粘合剂选自下组:预胶化淀粉、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、共聚维酮、明胶、天然胶、淀粉糊、蔗糖、玉米糖浆、聚乙二醇和海藻酸钠。

[0122] 55、如项目50所述的药物组合物,其中所述润滑剂选自氢化植物油、硬脂酸钙和山嵛酸甘油酯。

[0123] 56、如项目50所述的药物组合物,其中所述水溶性填充剂选自下组:无水乳糖、乳糖一水合物、甘露醇、氯化钠、糖粉、山梨醇、蔗糖、肌醇和预胶化淀粉;所述水不溶性填充剂选自下组:微晶纤维素、磷酸钙和淀粉;所述粘合剂选自下组:预胶化淀粉、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、共聚维酮、明胶、天然胶、淀粉糊、蔗糖、玉米糖浆、聚乙二醇和海藻酸钠;以及所述润滑剂选自下组:氢化植物油、硬脂酸钙和山嵛酸甘油酯。

[0124] 57、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物基于干固体计包含26wt%到50wt%的水溶性填充剂。

[0125] 58、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物基于干固体计包含8wt%到32wt%的水不溶性填充剂。

[0126] 59、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物基于干固体计包含8wt%到24wt%的水不溶性填充剂。

[0127] 60、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物基于干固体计包含12wt%到20wt%的水不溶性填充剂。

[0128] 61、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物基于干固体计包含14wt%到18wt%的水不溶性填充剂。

[0129] 62、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物基于干固体计包含2wt%到6wt%的粘合剂。

[0130] 63、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物基于干固体计包含0.1wt%到2wt%的润滑剂。

[0131] 64、如项目56所述的药物组合物,其中所述组合物包含35wt%到40wt%的半酒石酸盐、26wt%到50wt%的水溶性填充剂、8wt%到32wt%的水不溶性填充剂、2wt%到6wt%的粘合剂和0.1wt%到2wt%的润滑剂,均基于干固体计。

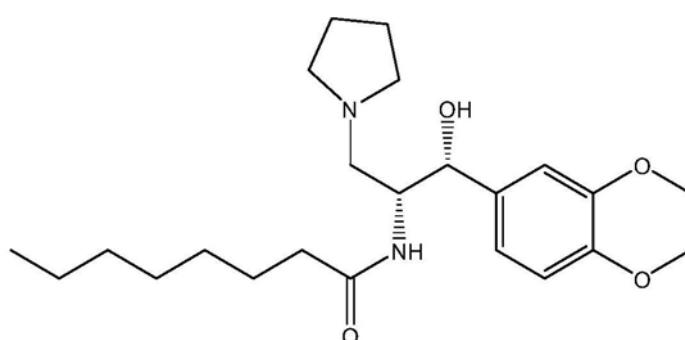
[0132] 65、如项目56所述的药物组合物,其中所述水溶性填充剂是乳糖一水合物;水不溶性填充剂是微晶纤维素;粘合剂是羟丙甲纤维素;以及润滑剂是山嵛酸甘油酯。

[0133] 66、如项目65所述的药物组合物,其中所述组合物包含35wt%到40wt%的半酒石酸盐、26wt%到50wt%的乳糖一水合物、8wt%到32wt%的微晶纤维素、2wt%到6wt%的羟丙甲纤维素和0.1wt%到2wt%的山嵛酸甘油酯,均基于干固体计。

[0134] 67、治疗患有法布里病的受试者的方法,所述方法包括:

[0135] a) 将有效量的式(I)化合物或其药学可接受的盐给予受试者;

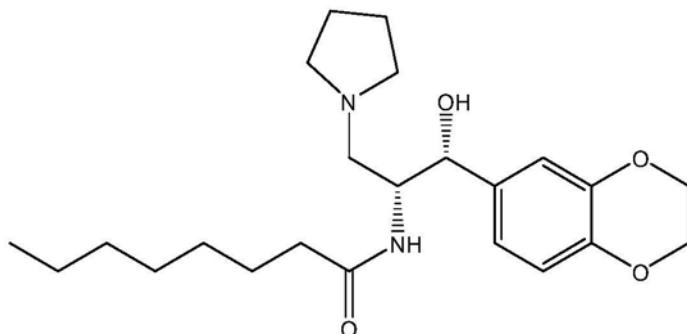
[0136]



[0137] b) 测试受试者以确定所述受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型;

- [0138] c) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，  
 [0139] 确定所述化合物的调整有效量；以及  
 [0140] d) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，将调整有效量的式(I)化合物给予受试者，和如果受试者是P450贫乏代谢型，将有效量的式(I)化合物给予受试者。  
 [0141] 68、治疗患有戈谢病的受试者的方法，所述方法包括：  
 [0142] a) 将有效量的式(I)化合物或其药学可接受的盐给予受试者；

[0143]



[0144] b) 测试受试者以确定所述受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型；

- [0145] c) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，  
 [0146] 确定化合物的调整有效量；以及

[0147] d) 如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，将调整有效量的式(I)化合物给予受试者，和如果受试者是P450贫乏代谢型，将有效量的式(I)化合物给予受试者。

[0148] 69、如项目67或68所述的方法，其中所述化合物是如项目1-15任一项所述的半酒石酸盐。

[0149] 70、如项目67-69任一项所述的方法，其中测试包括监控受试者的化合物谷血浆水平至少一周。

[0150] 71、如项目67-69任一项所述的方法，其中测试包括监控受试者的化合物谷血浆水平至少十周。

[0151] 72、如项目67-71任一项所述的方法，其中如果受试者的化合物的谷血浆水平低于5ng/ml，则所述受试者是P450酶中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型，且选择所述化合物的调整有效量，以使受试者的化合物的谷水平为至少5ng/mg。

[0152] 73、如项目67-71任一项所述的方法，其中给予有效量所述化合物后，如果所述化合物的血浆谷水平为至少5ng/ml，则所述受试者是P450酶贫乏型。

[0153] 74、如项目67或68所述的方法，其中步骤b)的测试在治疗开始之前或之后进行。

[0154] 75、如项目67-74任一项所述的方法，其中所述P450酶是CYP2D6酶和/或CYP3A4酶。

[0155] 76、如项目67-75任一项所述的方法，其中作为CYP2D6酶或CYP3A4酶抑制剂共同给药的结果，所述受试者是P450贫乏代谢型。

[0156] 77、如项目76所述的方法，其中所述抑制剂选自下组：帕罗西汀、氟西汀、奎尼丁和酮康唑。

[0157] 78、如项目67或69所述的方法,其中步骤b)的测试通过确定P450 酶的基因型来进行。

[0158] 79、如项目78所述的方法,其中所述P450酶是CYP2D6。

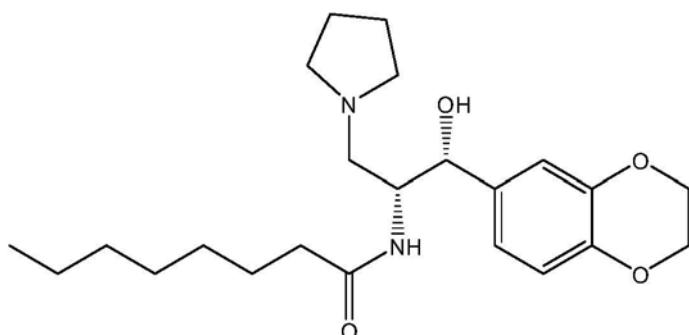
[0159] 80、如项目67-79任一项所述的方法,其中所述化合物的有效量是 25毫克到200毫克的每日两次剂量。

[0160] 81、如项目67-79任一项所述的方法,其中所述化合物的有效量是 50毫克的每日两次剂量。

[0161] 82、治疗患有法布里病的受试者的方法,包括以下步骤:

[0162] a) 将有效量的由以下结构式代表的化合物或其药学可接受的盐给予受试者:

[0163]



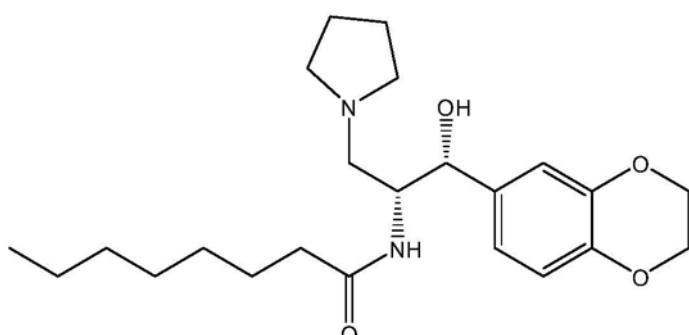
[0164] b) 评估受试者的化合物的谷血浆水平;

[0165] c) 调整给予受试者的化合物的量,以使受试者的化合物的谷血浆水平为至少5ng/ml。

[0166] 83、治疗患有戈谢病的受试者的方法,包括以下步骤:

[0167] a) 将有效量的由以下结构式代表的化合物或其药学可接受的盐给予受试者:

[0168]



[0169] b) 评估受试者的化合物的谷血浆水平;

[0170] c) 调整给予受试者的化合物的量,以使受试者的化合物的谷血浆水平为至少5ng/ml。

[0171] 84、如项目82或83所述的方法,其中在用化合物开始治疗前测试所述受试者从而评估所述受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型,且其中所述有效量是基于所述受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型来确定。

[0172] 85、如项目82、83或84所述的方法,其中所述化合物是如项目1-15 任一项所述的半酒石酸盐。

[0173] 86、如项目82或83所述的方法,其中在步骤b) 中也评估受试者的化合物的C<sub>max</sub>且其中在步骤c) 中调整给予受试者的化合物的量,以使受试者的化合物的谷血浆水平为至少

5ng/ml且受试者的化合物的C<sub>max</sub>低于100ng/ml。

[0174] 87、如项目82-86任一项所述的方法,其中所述P450酶是CYP2D6 酶和/或CYP3A4 酶。

[0175] 88、如项目82-86任一项所述的方法,其中作为协同给予P450酶抑制剂的结果,所述受试者是P450酶贫乏代谢型。

[0176] 89、如项目88所述的方法,其中所述抑制剂选自下组:帕罗西汀、氟西汀、奎尼丁和酮康唑。

[0177] 90、如项目82-86任一项所述的方法,其中评估所述受试者中P450 酶的表达来确定所述受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型。

[0178] 91、如项目90所述的方法,其中所述P450酶是CYP2D6或CYP3A4。

[0179] 92、如项目82-90任一项所述的方法,其中所述化合物的有效量是 25毫克到200毫克的每日两次剂量。

[0180] 93、如项目82-90任一项所述的方法,其中所述化合物的有效量是 50毫克的每日两次剂量。

## 附图说明

[0181] 图1显示式(I)半酒石酸盐的实验性XRPD图(室温)。

[0182] 图2是酶和底物降低疗法在降低戈谢小鼠肝中葡萄糖神经酰胺水平中的功效的图。肝GL1水平在未经处理的3个月大的戈谢小鼠(A)和用重组葡萄糖脑苷脂酶治疗2周后的小鼠(B)中测定。之后用重组葡萄糖脑苷脂酶处理的小鼠不经进一步处理(C)或用式(I)半酒石酸盐以150mg/kg给予治疗后(D)分析10周。也显示整个研究期间仅给予式(I)半酒石酸盐的小鼠(E)以及未经处理的年龄匹配对照小鼠(F)肝中GL1水平。数据用平均值±平均标准误差(SEM) (n=5) 表示。采用未配对t检验测定统计显著性。

[0183] 图3是酶和底物降低疗法在降低戈谢小鼠脾中葡萄糖神经酰胺水平中的功效的图。脾GL1水平在未经处理的3个月大的戈谢小鼠(A)和用重组葡萄糖脑苷脂酶治疗2周后的小鼠(B)中测定。之后用重组葡萄糖脑苷脂酶处理的小鼠不经进一步处理(C)或用式(I)半酒石酸盐治疗后(D)分析10 周。也显示整个研究期间仅给予式(I)半酒石酸盐的小鼠(E)以及未经处理的年龄匹配对照小鼠(F)脾中GL1水平。数据用平均值±平均标准误差 (SEM) (n=5) 表示。采用未配对t检验测定统计显著性。

[0184] 图4是酶和底物降低疗法在降低戈谢小鼠肺中葡萄糖神经酰胺水平中的功效的图。肺GL1水平在未经处理的3个月大的戈谢小鼠(A)和用重组葡萄糖脑苷脂酶治疗2周后的小鼠(B)中测定。之后用重组葡萄糖脑苷脂酶处理的小鼠不经进一步处理(C)或用式(I)半酒石酸盐治疗后(D)分析10 周。也显示整个研究期间仅给予式(I)半酒石酸盐的小鼠(E)以及未经处理的年龄匹配对照小鼠(F)肺中GL1水平。数据用平均值±平均标准误差 (SEM) (n=5) 表示。采用未配对t检验测定统计显著性。

[0185] 图5是显示肝中CD68染色程度的定量的图。肝切片上的CD68-阳性染色程度采用MetaMorph软件定量。显示的是未经处理的3个月大的戈谢肝(A)和用葡萄糖脑苷脂酶治疗后(B)的水平。也说明用酶处理然后不经进一步治疗学干预(C)或用式(I)半酒石酸盐治疗后(D)分析10周的小鼠。也显示仅给予式(I)半酒石酸盐的戈谢小鼠(E)和未经处理的年龄匹

配对照小鼠(F)肝中的染色程度。由每只小鼠的每一切片的十张400x图像的分析整理出数据。采用未配对t检验测定统计显著性。

[0186] 图6是显示式(I)半酒石酸盐在年幼D409V/基因敲除小鼠中的功效的图。式(I)半酒石酸盐每天通过经口灌食法以75或150mg/kg的剂量给予10周大D409V/基因敲除小鼠,持续10周。在通过HP-TLC研究结束时评估肝、肺、脉管系统和脾中的葡糖神经酰胺水平。数据作为未经处理的年龄匹配对照小鼠中GL-1的百分比显示。虚线表示正常野生型小鼠中观察到的葡糖神经酰胺水平。相对于未经处理的对照(双尾、未配对 t检验) \*p<0.05; \*\*p<0.01。数据作为平均值+平均标准误差(SEM)显示,对于75mg/kg,n=5;对于150mg/kg,n=6。

[0187] 图7显示式(I)半酒石酸盐治疗对于法布里小鼠肝、心、肾、脾、脑和血液中GL-3积累的影响。

[0188] 图8显示式(I)半酒石酸盐治疗对于法布里小鼠周围神经病的发作和进展的影响的图。

[0189] 图9显示用式(I)半酒石酸盐处理的法布里小鼠中一些肾功能标志物的测定的图。

[0190] 图10显示接受不同药物疗法的小鼠群体的ERT和SRT研究的时间线:A) 法布瑞酶两月一次,没有式(I)半酒石酸盐;B) 法布瑞酶两月一次和食物中的式(I)半酒石酸盐;C) 在研究开始时和在研究第四个月时给予法布瑞酶和食物中的式(I)半酒石酸盐;D) 没有法布瑞酶,食物中的式(I)半酒石酸盐;和E) 没有药物疗法。

[0191] 图11显示六只小鼠群体(A-E法布里-Rag;以及F野生型)中以ng/mL 血液表示的血液GL-3水平的图;所述小鼠群体接受以下治疗:A) 法布瑞酶两月一次,没有式(I)半酒石酸盐;B) 法布瑞酶两月一次和食物中的式(I)半酒石酸盐;C) 在研究开始时和在研究第四个月时给予法布瑞酶和食物中的式(I)半酒石酸盐;D) 没有法布瑞酶,食物中的式(I)半酒石酸盐;E) 没有药物疗法;和F) 没有药物疗法。

[0192] 图12显示法布里-Rag小鼠肝和肾中的GL-3水平的图;小鼠群体接受以下治疗:A) 法布瑞酶两月一次,没有式(I)半酒石酸盐;B) 法布瑞酶两月一次和食物中的式(I)半酒石酸盐;C) 在研究开始时和在研究第四个月时给予法布瑞酶和食物中的式(I)半酒石酸盐;D) 没有法布瑞酶,食物中的式(I)半酒石酸盐;和E) 没有药物疗法。

[0193] 图13显示法布里-Rag小鼠的尿GL-3水平的图;小鼠群体接受以下治疗:A) 法布瑞酶两月一次,没有式(I)半酒石酸盐;B) 法布瑞酶两月一次和食物中的式(I)半酒石酸盐;C) 在研究开始时和在研究第四个月时给予法布瑞酶和食物中的式(I)半酒石酸盐;D) 没有法布瑞酶,食物中的式(I)半酒石酸盐;和E) 没有药物疗法。

[0194] 图14是显示接受以下治疗的法布里-Rag小鼠的热敏性的以秒表示的潜伏期的图:法布瑞酶两月一次,没有式(I)半酒石酸盐;法布瑞酶两月一次和食物中的式(I)半酒石酸盐;在研究开始时和在研究第四个月时给予法布瑞酶和食物中的式(I)半酒石酸盐;没有法布瑞酶,食物中的式(I)半酒石酸盐;没有药物疗法;野生型小鼠;和在三个月未经处理。

[0195] 图15是显示在85°C下暴露3天后含有式(I)半酒石酸盐、胶囊级乳糖一水合物和Avicel PH 301(微晶纤维素)的不同混合物的HPLC痕迹的降解面积的总量。HPLC痕迹的降解面积是对于降解的峰的总面积相对于对于式(I)半酒石酸盐和降解产物的峰的总面积的比率。

[0196] 发明详述

[0197] 本申请提供式(I)半酒石酸盐的独特晶型以及含有此处描述的式(I)半酒石酸盐晶型的式(I)半酒石酸盐的新的药物组合物。本申请也提供抑制需要治疗的受试者的葡萄糖神经酰胺合酶或降低需要治疗的受试者的鞘糖脂浓度的方法。此外,本申请提供制备式(I)半酒石酸盐的特定晶型的方法。本申请也提供式(I)半酒石酸盐的稳定的药物制剂、用式(I)化合物或其药学可接受盐(包括式(I)半酒石酸盐)的联合治疗以及用使药物/药物相互作用的风险最小化的式(I)化合物或其药学可接受盐(包括式(I)半酒石酸盐)治疗的方法。

[0198] 式(I)半酒石酸盐的晶型

[0199] 在一个具体的实施方式中,至少特定重量百分比的式(I)半酒石酸盐是结晶的。特定重量百分比包括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70%至100%之间的百分比。

[0200] 在另一个具体的实施方式中,至少特定重量百分比的式(I)半酒石酸盐是式(I)半酒石酸盐的单晶型。特定重量百分比包括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70%至100%之间的百分比。

[0201] 如本发明所使用,“结晶”是指具有晶体结构的固体,其中单个分子具有高度均匀的规则的锁住型(locked-in)化学构造。结晶的式(I)半酒石酸盐可以是式(I)半酒石酸盐的单晶型的晶体,或不同的单晶型的晶体混合物。单晶型是指式(I)半酒石酸盐作为单晶或作为其中各晶体具有相同晶型的多个晶体。

[0202] 当特定重量百分比的式(I)半酒石酸盐是单晶型时,其余式(I)半酒石酸盐是无定形的式(I)半酒石酸盐和/或一种或多种除所述单晶型以外的其他晶型的式(I)半酒石酸盐的某种组合。当结晶的式(I)半酒石酸盐定义为特定百分比的一种特定晶型的式(I)半酒石酸盐时,其余由无定形和/或除了指定的一种或多种特定晶型的晶型组成。单晶型的实例包括以本发明所讨论的一种或多种性质为特征的A型的式(I)半酒石酸盐。

[0203] 因为酒石酸具有两个羧酸基团,其可以与不同摩尔比的由式(I)代表的化合物形成酒石酸盐(酒石酸的共轭碱)。例如,其中酒石酸盐与式(I)的摩尔比为约一比一的盐是式(I)酒石酸盐(1个酒石酸盐:1个式(I));和其中酒石酸盐与式(I)的摩尔比为约一比二的盐是式(I)半酒石酸盐(1个酒石酸盐:2个式(I))。

[0204] 半酒石酸盐可以以多种立体异构形式存在。立体异构体是仅在其空间排列上不同的化合物。对映体是其镜像不可叠加的立体异构体对,最常见是因为它们包含作为手性中心的不对称的取代碳原子。非对映体是不作为镜像相关的立体异构体,最常见是因为它们包含两个或更多个不对称的取代碳原子。

[0205] 当立体化学命名(例如为L-(+)-酒石酸)或通过结构(例如为式(I))描述时,所命名或描述的立体异构体的纯度为相对于其他立体异构体至少60%、70%、80%、90%、99%或99.9重量%。当单个对映体命名(例如为L-(+)-酒石酸)或通过结构(例如为式(I))描述时,所描述或命名的对映体的光学纯度至少为80%、90%、99%或99.9重量%。光学纯度重量百分比是对映体的重量与对映体重量加上其光学异构体重量的比率。

[0206] “消旋体”或“外消旋混合物”是指等摩尔量的两种对映体的化合物,其中这种混合物不显示旋光性;即,它们不旋转偏振光平面。

[0207] 酒石酸具有三种立体异构体:L-(+)-酒石酸或右旋酒石酸及其对映体、左旋酒石酸或D-(-)-酒石酸、以及无手性形式,内消旋酒石酸。名称L或D不表明酸旋转偏振光平面的能力。

[0208] 任何立体异构体的酒石酸可用于制备式(I)半酒石酸盐。例如,所述半酒石酸盐可以仅由一种其立体异构体形成,或由其组合形成。所述半酒石酸盐可以选自D-半酒石酸盐、L-半酒石酸盐、内消旋半酒石酸(hemimesotartaric acid)或外消旋D,L-半酒石酸盐。在一个具体的实施方式中,所述半酒石酸盐是L-半酒石酸盐。“L-半酒石酸盐”是指由L-酒石酸形成的半酒石酸盐。外消旋D,L-半酒石酸盐是指D-酒石酸盐和L-酒石酸盐都用于制备式(I)半酒石酸盐。外消旋D,L-半酒石酸盐中D-酒石酸盐的量可以大于、等于或小于所有在L-酒石酸盐的量。

[0209] “左旋”表示当通过不对称化合物时偏振光向左转。表示左旋的前缀是“L”。

[0210] “右旋”表示当通过不对称化合物时偏振光向右转。表示左旋的前缀是“D”。

[0211] 式(I)半酒石酸盐的制备

[0212] 式(I)半酒石酸盐可以通过将式(I)与适当溶剂中的L-酒石酸混合来制备。式(I)半酒石酸盐的沉淀可通过添加晶种来促进。可以使用的溶剂是甲醇、水、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、或其组合。

[0213] 例如,式(I)半酒石酸盐的特定固体形式可通过缓慢蒸发、缓慢冷却和抗溶剂沉淀来制备。可用于这些方法中的溶剂包括水、庚烷、己烷、甲苯、二氯甲烷、乙醇、异丙醇、乙腈、乙酸乙酯、甲醇、丙酮、甲基叔丁基醚(本发明称为“TBME”)、对二噁烷、和四氢呋喃(本发明称为“THF”)。

[0214] 式(I)半酒石酸盐固体形式可从在溶剂或溶剂混合物中的式(I)半酒石酸盐溶液通过溶剂蒸发来制备。适当的溶剂混合物包括甲醇、乙醇、丙酮、水、乙酸乙酯和二氯甲烷。优选的溶剂混合物包括乙醇、甲醇、水和丙酮。

[0215] 式(I)半酒石酸盐固体形式可通过缓慢冷却式(I)半酒石酸盐在溶剂中的热溶液来制备。适当的溶剂包括乙醇、甲醇、水、丙酮和乙酸乙酯。

[0216] 式(I)半酒石酸盐固体形式可通过快速冷却式(I)半酒石酸盐在溶剂中的热溶液、通过将所述溶液置于冷却浴中来制备。适当的溶剂包括乙醇、甲醇、丙酮、水、乙酸乙酯或这些溶剂的混合物。

[0217] 式(I)半酒石酸盐固体形式可通过在给定温度下将上述的在溶剂中的式(I)半酒石酸盐溶液添加到抗溶剂中来制备。更具体地,所述抗溶剂是乙酸乙酯、丙酮、乙腈、甲苯、THF、TBME、对二噁烷、异丙醇或庚烷。具体的溶剂/抗溶剂混合物包括甲醇/乙酸乙酯、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/对二噁烷、乙醇/乙酸乙酯、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/异丙醇、水/乙腈、水/丙酮、二氯甲烷/庚烷、二氯甲烷/丙酮、二氯甲烷/乙酸乙酯、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/对二噁烷和二氯甲烷/异丙醇。

[0218] 优选的溶剂/抗溶剂混合物包括甲醇/乙酸乙酯、甲醇/丙酮、甲醇/TBME和水/丙酮。

[0219] 如本发明所使用,“抗溶剂”是指其中式(I)半酒石酸盐具有低溶解度并引起半酒

石酸盐以细粉或结晶形式从溶液中沉淀析出的溶剂。

[0220] 产生式(I)半酒石酸盐的固体形式的其他方法包括使固体从乙酸乙酯/丙酮中沉淀并任选在室温下干燥所形成的固体。在另一个方法中,所述固体能在添加或不添加晶种的情况下从丙酮中重结晶。或者,式(I)半酒石酸盐可从乙酸乙酯/丙酮溶剂中沉淀并从乙酸乙酯中重结晶。或者,式(I)半酒石酸盐可从异丙醇中重结晶。或者式(I)半酒石酸盐可仅采用丙酮制备,不经进一步重结晶。或者式(I)半酒石酸盐可在短暂回流后从丙酮中沉淀,不经进一步重结晶。

[0221] 或者,式(I)半酒石酸盐可在添加或不添加晶种的情况下从甲醇/丙酮中重结晶。或者,式(I)半酒石酸盐可在添加或不添加晶种的情况下从水/丙酮中重结晶。

[0222] 式(I)半酒石酸盐晶型的表征

[0223] 在一个具体的实施方式中,式(I)半酒石酸盐的晶型(A晶型)特征在于20角5.1°、6.6°、10.7°、11.0°、15.9°和21.7°处的一、二、三、四或五个主要XRPD峰。在一个更具体的实施方式中,所述晶型的特征在于XRPD峰的20角度为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°和23.5°。应理解给定的20角度是指给定值±0.2°。

[0224] 如本发明所使用,“主要XRPD峰”是指相对强度大于25%的XRPD峰。相对强度计算为目标峰的峰强度与最大峰的峰强度的比率。

[0225] 采用式(I)半酒石酸盐治疗的方法

[0226] 如本发明所使用,受试者是哺乳动物,优选人患者,但也可以是需要兽医治疗的动物,例如伴侣动物(例如狗、猫等)、农场动物(例如牛、羊、猪、马等)或实验室动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠等)。受试者和患者可互换使用。

[0227] 本申请的一个实施方式是通过将有效量的上述式(I)半酒石酸盐(包括其晶型)给予受试者从而减缓、抑制或降低需要治疗的受试者的葡萄糖神经酰胺合酶活性或降低需要治疗的受试者的鞘糖脂浓度的方法。

[0228] 需要治疗的受试者是患有受益于抑制细胞(尤其是细胞的溶酶体或膜)中的葡萄糖神经酰胺合酶或降低细胞(尤其是细胞的溶酶体或膜)中的鞘糖脂浓度的病症或疾病的受试者。已经证明葡萄糖神经酰胺合酶抑制剂可用于治疗溶酶体贮积病,例如Tay-Sachs病、戈谢病或法夫里病(例如参见美国专利6,569,889;6,255,336;5,916,911;5,302,609;6,660,749;6,610,703;5,472,969;5,525,616,其全部教导以引用方式合并于此)。

[0229] 病症或疾病的实例包括多囊肾病和膜肾小球病(参见美国临时专利申请61/130,401和61/102,541,其全部教导以引用方式合并于此)、血管球性肾炎和肾小球硬化症(参见美国临时专利申请61/137,214)、狼疮(参见PCT/US2009/001773,其全部教导以引用方式合并于此)、糖尿病,包括2型糖尿病(参见WO 2006/053043,其全部教导以引用方式合并于此);治疗包括细胞生长和分裂,包括癌症、胶原蛋白血管病、动脉粥样硬化和糖尿病的肾过度生长的疾病(参见美国专利6,916,802和5,849,326,其全部教导以引用方式合并于此);抑制动脉上皮细胞的生长(参见美国专利6,916,802和5,849,326);治疗患有感染的患者(参见Svensson, M.等人,“Epithelial Glucosphingolipid Expression as a Determinant of Bacterial Adherence and Cytokine Production,”Infect. and Immun., 62:4404-4410 (1994),其全部教导以引用方式合并于此);预防寄主(即患者)产生

对抗肿瘤的抗体(参见Inokuchi,J.等人,"Antitumor Activity in Mice of an Inhibitor of Glycosphingolipid Biosynthesis,"Cancer Lett.,38:23-30(1987),其全部教导以引用方式合并于此);以及治疗肿瘤(参见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.等人,"Inhibition of Experimental Metastasis of Murine Lewis Lung Carcinoma by an Inhibitor of Glucosylceramide Synthase and its Possible Mechanism of Action,"Cancer Res.,50:6731-6737(1990)以及Ziche,M.等人,"Angiogenesis Can Be Stimulated or Repressed in In Vivo by a Change in GM3:GD3Ganglioside Ratio,"Lab.Invest.,67:711-715(1992),其全部教导以引用方式合并于此)。

[0230] 式(I)半酒石酸盐也可用于癌症疫苗样制剂(例如参见美国专利 6,569,889;6,255,336;5,916,911;5,302,609;6,660,749;6,610,703; 5,472,969;5,525,616)。

[0231] 式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)可在公开方法中用作单一治疗,即,作为给药以治疗症候的唯一药物活性成分。

[0232] 或者,式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)可在公开方法中用作与本领域已知用于治疗所需疾病或症候的其他治疗活性药物的联合治疗。“协同治疗”或“联合”或“联合治疗”或“协同给药”在本发明中可互换使用,且是指式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)在一种或多种其他治疗剂之前、之后或同时给药。在一个实施方式中,联合治疗用于治疗溶酶体病,例如戈谢病或法夫里病。或者,式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)作为单独制剂或作为联合制剂同时协同给药(即,同时)。或者,如由熟练的临床医生所决定,所述试剂可以在适当的时间内作为单独的组合物顺次给药(例如,足以允许治疗的药物效果重叠的时间)。式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)和一种或多种其他治疗剂可以以单剂量或多剂量、以适于实现所需治疗学效果的次序和时间表给药。

[0233] 治疗戈谢病有效的治疗剂包括葡糖脑苷脂酶、葡糖脑苷脂酶类似物、葡糖神经酰胺合酶抑制剂和与葡糖脑苷脂酶结合并恢复其正确构造的分子伴侣。葡糖脑苷脂酶或其类似物可以来源于人或哺乳动物。或者,葡糖脑苷脂酶及其类似物可以重组获得。葡糖脑苷脂酶类似物包括截短形式的酶和/或相对于天然酶的天然氨基序列带有氨基酸替换的酶,条件是保留生物活性。葡糖脑苷脂酶类似物的实例包括伊米昔酶(Imiglucerase)(由Genzyme公司以商品名Cerezyme®销售)、Taliglucerase Alfa(将以商品名Uplyso®销售且由Protalix Biotherapeutics公司开发)和Velaglucerase Alfa(由Shire PLC开发),其是重组DNA产生的人β-葡糖脑苷脂酶类似物。分子伴侣的实例包括isofagomine(由Amicus Therapeutics,Cranbury,NJ以商品名Plicera™开发)。Isofagomine也称为afegostat酒石酸盐,且包含isofagomine的酒石酸盐形式作为其活性成分。葡糖脑苷脂酶抑制剂的实例包括miglustat(由Actelion Pharmaceuticals Ltd.Allschwil,Switzerland以商品名Zavesca™开发)。

[0234] 治疗法夫里病有效的治疗剂包括半乳糖苷酶A、半乳糖苷酶A类似物和与半乳糖苷酶A结合并恢复其正确构型的分子伴侣。半乳糖苷酶A 或其类似物可以来源于人或哺乳动物。或者,半乳糖苷酶A及其类似物可以重组获得。半乳糖苷酶A类似物包括截短形式的酶

和/或相对于天然酶的天然氨基序列带有氨基酸替换的酶,条件是保留生物活性。半乳糖苷酶A类似物的实例包括半乳糖苷酶β(由Genzyme公司以商品名**Fabrazyme®**作为冻干药物销售的重组人α-半乳糖苷酶)和半乳糖苷酶α(由Shire PLC以商品名**Replagal®**销售的重组蛋白)。分子伴侣的实例包括migalastat(由Amicus Therapeutics,Cranbury,NJ以商品名**Amigal™**开发,包含migalastat盐酸盐作为其活性成分的药物)。

[0235] 在一个实施方式中,用于治疗戈谢病或法夫里病的联合治疗分两个阶段进行。在第一阶段,治疗戈谢病或法夫里病有效的药物(通常是葡糖脑苷脂酶或其类似物治疗戈谢病和半乳糖苷酶或其类似物治疗法夫里病)用于稳定受试者。例如,在戈谢病(或法夫里病)中这些药物之一用于降低内脏器官例如肝、脾、肺和/或肾中的GL-1贮积的负担。一旦该阶段实现,式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)用于第二阶段作为方便的维持治疗。第一阶段通常持续直到一、二、三或四周或直到一、二、三、四、六、九或十二个月,或直到受试者的血小板计数等于或大于100,000mm<sup>3</sup>;血红蛋白浓度等于或大于11g/dl(女性)或12g/dl(男性);和/或受试者的脾体积小于或等于正常体积的10倍且肝体积小于或等于正常体积的1.5倍。一旦开始用式(I)化合物治疗,第一阶段的给药通常停止。

[0236] 如本发明所使用,“有效量”是指能有效减缓正在治疗的受试者的现有症状并使受试者的不希望有的副作用最小的量。准确制剂、给药途径和剂量通过个人医师考虑到患者情况来选择。剂量和间隔时间可个别调节以提供足以维持所需治疗学效果的活性化合物的血浆水平。除患者情况和给药方式之外,给药剂量将取决于患者症状的严重程度和患者的年龄和体重。有效量通常将导致上述化合物的血浆谷水平为至少5ng/ml。如果给药有效量的化合物后血浆谷水平低于5ng/ml,给予该受试者的剂量变化至“调整有效量”,这样化合物的谷水平为至少5ng/ml。或者,如果给药有效量的化合物后化合物的谷血浆水平低于5ng/ml和/or C<sub>max</sub>高于100ng/ml,给予该受试者的剂量变化至“调整有效量”,这样化合物的谷血浆水平为至少5ng/ml且C<sub>max</sub>低于100ng/ml。有效量可以为0.1到500mg/每天。或者,有效量为50-300mg/天。在另一个可选方案中,有效量为100-300mg/天。本申请化合物可以连续给药或以特定时间间隔给药。例如,本申请化合物可以每天给药1、2、3或4次,例如每日制剂或每日两次制剂。可采用可商购试验来确定最佳剂量范围和/或给药时间表。

[0237] 在一个实施方式中,式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)的有效量是(不管是作为单一治疗还是协同治疗)日剂量为25毫克到300毫克(或者25毫克到150毫克;在另一个可选方案中为50毫克到300毫克;以及在另一个可选方案中为100毫克到300毫克),例如25、50、100、200或300毫克每天。在一个具体的实施方式中,式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)的有效量是(不管是作为单一治疗还是协同治疗)每日两次剂量为50毫克(总共100毫克每天)、100毫克(总共200毫克每天)或150毫克(总共300毫克每天)。在一个可选实施方式中,式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)的有效量是(不管是作为单一治疗还是协同治疗)以100毫克/天、200毫克/天或300毫克/天的每日一次剂量给药。

[0238] 在另一个实施方式中,有效量通过假设受试者是“P450贫乏代谢型”然后假设谷血浆水平和/or C<sub>max</sub>来确定。如果谷血浆水平低于5ng/ml,或化合物的谷水平低于5ng/ml和/or C<sub>max</sub>高于100ng/ml;或所述受试者确定为P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型,则如

下所述将给予受试者的量变化至调整有效量。P450贫乏代谢型的有效量通常是(不管是作为单一治疗还是协同治疗)100-200毫克每天,例如100或200毫克,作为每日一次剂量或每日两次剂量。

[0239] 通常,本申请的药物组合物可以在餐前或餐后给药,或在餐中给药。如此处所使用,“餐前”或“餐后”通常分别是用餐开始或结束的二小时内,优选一小时内,更优选三十分钟内,最优选十分钟内。

[0240] 目前已经发现式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)通过肝、主要通过细胞色素P450酶代谢。细胞色素P450(“CYP”)是主要的肝异型生物代谢酶。通常在人肝中表达有十一种异型生物代谢细胞色素P450(即CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8/9/18/19、CYP2D6、CYP2E1和CYP3A4/5)。目前也已经发现CYP2D6和CYP3A4是负责脱毒式(I)化合物及其药学活性盐例如式(I)半酒石酸盐的主要P450异构体。P450酶的活性水平根据个体而异。例如,个体可以分为P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型。由于个体的P450活性的低水平可以引起药物/药物相互作用(“DDI”),本发明另一个实施方式是确定受试者是P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型。如果受试者是P450中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型,则给予该受试者的剂量应该升高至“调整有效剂量”,即,导致化合物的谷血浆水平为至少5ng/ml的量;或导致化合物的谷水平为至少5ng/ml和化合物的C<sub>max</sub>低于100ng/ml的量。所述剂量可以逐渐升高,且受试者重复试验一次、两次、三次、四次或实现调整有效剂量所需要的次数。

[0241] 对于CYP 2D6基因有着四种预测的表型:

[0242] “P450贫乏代谢型(poor P450metabolizer)”携带两个突变型等位基因,这导致酶活性完全丧失。

[0243] “P450中间代谢型(intermediate P450metabolizer)”具有一个活性降低的等位基因和一个无效等位基因。

[0244] “P450广泛代谢型(extensive P450metabolizer)”具有至少一个和至多两个正常功能的等位基因。

[0245] “P450超快代谢型(ultra rapid P450metabolizer)”携带多拷贝(3-13)的功能性等位基因并产生过量酶活性。

[0246] 受试者通常通过确定基因型或通过监控由P450酶例如CYP2D6或CYP3A4代谢的药物的谷血浆水平从而评估为P450贫乏代谢型、中间代谢型或广泛代谢型/超快代谢型。通常,用所述化合物进行治疗开始后,监控受试者的式(I)化合物或其药学可接受的盐(包括其半酒石酸盐)的谷血浆水平和/或C<sub>max</sub>直到一、二、三或四周,或直到一、二、三、六、九或十二个月或更久。根据需要进行剂量调整,以将水平维持在所述限制内,即谷血浆水平为5ng/ml或以上。

[0247] 作为用P450酶抑制剂的某种药物治疗的结果,受试者可以变成P450贫乏代谢型。这种药物的实例包括帕罗西汀、氟西汀、奎尼丁或酮康唑。或者,作为P450酶的低表达的结果,受试者是P450贫乏代谢型。在这种情况下,低表达可以通过测定受试者中P450酶表达(即,确定受试者的P450酶基因型)来评估。例如,CYP2D6的表达通常通过PCR(McElroy等人“CYP2D6 Genotyping as an Alternative to Phenotyping for Determination of Metabolic Status in a Clinical Trial Setting”,AAPS Pharmsi (2000) 2 (4):article

33 (<http://www.pharmsci.org/>) 或通过基于微阵列的药物基因组学测试 (Background Information, Roche Diagnostics “The CYP450Gene Family and Drug Metabolism”, Hoffmann La Roche Ltd.) 来评估, 其全部教导以引用方式合并于此。同样, 可在开始治疗前方便地确定受试者的P450 表达 (例如CYP2D6) 基因型, 且如有必要给予调整有效量。在开始治疗前确定基因型的情况下, 仍然可以监控所述化合物的谷血浆水平和C<sub>max</sub>, 并根据需要调整剂量。

[0248] migalastat、半乳糖苷酶、伊米昔酶、isofagomine 和 miglustat 的有效量为如药物标签上所述或如各药物的临床试验中所进行。

[0249] 式 (I) 化合物可与药学可接受的酸反应以形成药学可接受的盐。药学可接受的酸的实例包括无机酸, 例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等; 和有机酸, 例如对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等。这种盐的实例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、一氢磷酸盐、二氢磷酸盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、醋酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、酞酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 $\gamma$ -羟基丁酸盐、羟乙酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐等。

[0250] 包含式 (I) 半酒石酸盐的药物组合物

[0251] 式 (I) 化合物或其药学可接受的盐 (包括其半酒石酸盐) 的适当制剂和给药方式包括美国专利7,253,185中描述的那些, 其全部教导以引用方式合并于此。式 (I) 半酒石酸盐的优选制剂在下以下段落中描述。

[0252] 本发明的一个实施方式是含有式 (I) 半酒石酸盐、至少一种水溶性填充剂、至少一种水不溶性填充剂、至少一种粘合剂和至少一种润滑剂的药物组合物。合适的水溶性填充剂例如可以包括无水乳糖、乳糖一水合物、甘露醇、氯化钠、糖粉、山梨醇、蔗糖、肌醇和预胶化淀粉。合适的水不溶性填充剂例如可以包括微晶纤维素、磷酸钙和淀粉。合适的粘合剂例如可以包括预胶化淀粉、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、共聚维酮、明胶、天然胶、淀粉糊、蔗糖、玉米糖浆、聚乙二醇和海藻酸钠。合适的润滑剂例如可以包括氢化植物油、硬脂酸钙和山嵛酸甘油酯。在所述药物组合物的一个实施方式中, 水溶性填充剂选自下组: 无水乳糖、乳糖一水合物、甘露醇、氯化钠、糖粉、山梨醇、蔗糖、肌醇和预胶化淀粉; 水不溶性填充剂选自下组: 微晶纤维素、磷酸钙和淀粉; 粘合剂选自下组: 预胶化淀粉、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、共聚维酮、明胶、天然胶、淀粉糊、蔗糖、玉米糖浆、聚乙二醇和海藻酸钠; 以及润滑剂选自下组: 氢化植物油、硬脂酸钙和山嵛酸甘油酯。

[0253] 所述药物制剂基于干固体计包含8wt% 到32wt%、8wt% 到24wt%、12wt% 到20wt% 或14wt% 到18wt% 的水不溶性填充剂。

[0254] 所述药物制剂基于干固体计包含26wt% 到50wt%、30wt% 到46wt%、34wt% 到46wt% 或38wt% 到44wt% 的水溶性填充剂。

[0255] 所述药物制剂基于干固体计包含30wt% 到45wt%、35wt% 到40wt% 和36wt% 到

39wt%的式(I)半酒石酸盐。

[0256] 所述药物制剂基于干固体计通常包含2wt%到6wt%的粘合剂。

[0257] 所述药物制剂基于干固体计通常包含0.1wt%到2wt%的粘合剂。

[0258] 在一个具体的实施方式中,所述药物制剂包含8wt%到32wt%的水不溶性填充剂、26wt%到50wt%的水溶性填充剂、30wt%到45wt%的式(I)半酒石酸盐、2wt%到6wt%的粘合剂和0.1wt%到2wt%的粘合剂,均基于干固体计。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;和水不溶性填充剂是微晶纤维素。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;水不溶性填充剂是微晶纤维素;粘合剂是羟丙甲基纤维素;以及润滑剂是山嵛酸甘油酯。

[0259] 在一个具体的实施方式中,所述药物制剂包含8wt%到32wt%的水不溶性填充剂、26wt%到50wt%的水溶性填充剂、35wt%到40wt%的式(I)半酒石酸盐、2wt%到6wt%的粘合剂和0.1wt%到2wt%的粘合剂,均基于干固体计。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;和水不溶性填充剂是微晶纤维素。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;水不溶性填充剂是微晶纤维素;粘合剂是羟丙甲基纤维素;以及润滑剂是山嵛酸甘油酯。

[0260] 在另一个具体的实施方式中,所述药物制剂包含8wt%到24wt%的水不溶性填充剂、30wt%到46wt%的水溶性填充剂、35wt%到40wt%的式(I)半酒石酸盐、2wt%到6wt%的粘合剂和0.1wt%到2wt%的粘合剂,均基于干固体计。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;和水不溶性填充剂是微晶纤维素。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;水不溶性填充剂是微晶纤维素;粘合剂是羟丙甲基纤维素;以及润滑剂是山嵛酸甘油酯。

[0261] 在另一个具体的实施方式中,所述药物制剂包含12wt%到20wt%的水不溶性填充剂、34wt%到46wt%的水溶性填充剂、35wt%到40wt%的式(I)半酒石酸盐、2wt%到6wt%的粘合剂和0.1wt%到2wt%的粘合剂,均基于干固体计。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;和水不溶性填充剂是微晶纤维素。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;水不溶性填充剂是微晶纤维素;粘合剂是羟丙甲基纤维素;以及润滑剂是山嵛酸甘油酯。

[0262] 在另一个具体的实施方式中,所述药物制剂包含14wt%到18wt%的水不溶性填充剂、38wt%到44wt%的水溶性填充剂、35wt%到40wt%的式(I)半酒石酸盐、2wt%到6wt%的粘合剂和0.1wt%到2wt%的粘合剂,均基于干固体计。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;和水不溶性填充剂是微晶纤维素。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;水不溶性填充剂是微晶纤维素;粘合剂是羟丙甲基纤维素;以及润滑剂是山嵛酸甘油酯。

[0263] 在另一个具体的实施方式中,所述药物制剂包含14wt%到18wt%的水不溶性填充剂、38wt%到44wt%的水溶性填充剂、36wt%到39wt%的式(I)半酒石酸盐、2wt%到6wt%的粘合剂和0.1wt%到2wt%的粘合剂,均基于干固体计。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;和水不溶性填充剂是微晶纤维素。更具体地,水溶性填充剂是乳糖一水合物;水不溶性填充剂是微晶纤维素;粘合剂是羟丙甲基纤维素;以及润滑剂是山嵛酸甘油酯。

[0264] 本发明将通过不以任何方式限制本发明的以下实施例说明。

## 具体实施方式

[0265] 实施例1:式(I)盐的制备

[0266] 与其他盐相比,式I的半酒石酸盐容易结晶并显示许多有利性质。例如,以下酸用于制备由式(I)代表的化合物的盐:柠檬酸(生成1:1、1:2和1:3(盐:式I)比例的盐);L-苹

果酸(1:1和1:2)；甲磺酸(1:1)；富马酸(1:1和1:2)；盐酸(1:1)；乙酸(1:1)；和酒石酸(1:1和1:2)。仅由盐酸(1:1)、酒石酸(1:1)和酒石酸(1:2)产生的盐是固体形式。这三种盐中,发现盐酸(1:1)和酒石酸(1:1)是吸湿性的和非结晶的,因此不能用于药物产品。发现由式(I)代表的化合物的半酒石酸盐(1个盐:2个式I)是结晶的和非吸湿性的。

[0267] 用丙酮制备式(I)半酒石酸盐

[0268] 通过回流溶液将L-酒石酸(6.02g, 40.11mmol, 0.497当量)溶于丙酮(175mL)中,然后冷却到室温。在室温下将式(I)游离碱(32.67g, 80.76 mmol)溶于丙酮(300mL)中。在室温下在15分钟内将L-酒石酸溶液添加至式(I)游离碱溶液中。添加中途便形成白色沉淀。混合物在室温下搅拌0.5小时,然后短暂回流并冷却到室温。在室温下搅拌0.5小时后,过滤该白色沉淀。所述白色固体用丙酮(2x 130mL)洗涤两次。所述固体风干、然后在55–60°C下真空干燥。产量为36.66g (95%)。

[0269] 用5%甲醇于丙酮中制备式(I)半酒石酸盐

[0270] 将10g/24.7mmol式(I)游离碱溶于120mL或240mL的5%甲醇/丙酮中。将1.85g/12.3mmol L-酒石酸通过加热至40–45°C而溶于60mL或 120mL的5%甲醇/丙酮(N或2N)中,并将该溶液添加至第一个溶液中。1小时后无沉淀,添加1mg式(I)半酒石酸盐作为晶种。5分钟后发生沉淀,再继续搅拌反应30分钟。然后反应加热回流5分钟(沉淀是完全可溶的),然后在20–22°C水浴中冷却到室温。形成沉淀并继续搅拌反应3 小时。最终产物通过过滤收集并用2x40mL的丙酮洗涤,然后在55–60 °C真空烘箱中干燥16小时。产物重量为8.72g/产率为74%。

[0271] 用1%水于丙酮中制备式(I)半酒石酸盐

[0272] 室温下将式(I)游离碱(10g/24.7mmol)溶于120mL或240mL的1%水 /丙酮中。将1.85g/12.3mmol L-酒石酸通过加热至40–45°C而溶于60mL 或120mL的1%水/丙酮(N或2N)中,并将该溶液添加至第一个溶液中。1小时后无沉淀,添加1mg式(I)半酒石酸盐作为晶种。5分钟后发生沉淀,再继续搅拌反应30分钟。然后反应加热回流5分钟(沉淀不是完全可溶的),然后在20–22°C水浴中冷却到室温。形成沉淀并继续搅拌反应3小时。最终产物通过过滤收集并用2x40mL的丙酮洗涤,然后在55–60 °C真空烘箱中干燥16小时。产物重量为8.62g,产率为73%。

[0273] 用5%甲醇于丙酮中重结晶式(I)半酒石酸盐

[0274] 将式(I)半酒石酸盐(3.06g)在回流下溶于116mL的5%甲醇/丙酮中。该溶液冷却至室温并在室温下搅拌2小时。过滤白色沉淀并用10mL的 5%甲醇/丙酮洗涤,然后用丙酮(15mL)洗涤。在55–60°C真空干燥18小时后,获得2.38g式(I)半酒石酸盐(回收率78%)。

[0275] 用1%H<sub>2</sub>O于丙酮中重结晶式(I)半酒石酸盐

[0276] 将式(I)半酒石酸盐(3.05g)在回流下溶于125mL的1%H<sub>2</sub>O/丙酮中。该溶液冷却至室温并在室温下搅拌2小时。过滤白色沉淀并用10mL的 1%H<sub>2</sub>O/丙酮洗涤,然后用丙酮(15mL)洗涤。在55–60°C真空干燥18小时后,获得2.35g式(I)半酒石酸盐(回收率77%)。

[0277] 实施例2:制备结晶的式(I)半酒石酸盐

[0278] 式(I)半酒石酸盐通过若干方法结晶。批次1采用乙酸乙酯/丙酮溶剂制备并在室温下干燥。批次3采用乙酸乙酯/丙酮溶剂制备并从乙酸乙酯中重结晶。批次4采用批次1原料从丙酮中重结晶。批次5从异丙醇中重结晶。批次7类似于批次1采用乙酸乙酯/丙酮溶剂

制备,但以大规模制备,批次8仅采用丙酮制备,不经进一步重结晶。批次9仅采用丙酮和短暂回流制备,也不经进一步重结晶。

[0279] 表1:批次1-9的式(I)半酒石酸盐的多态性筛选概要

[0280]

批号	工艺方法	DSC		显微 镜	TGA
		熔点(°C)	焓 (J/g)		
1	丙酮/乙酸乙酯 沉淀*	162	-81.4	结晶	100°C时 99.91% 175°C时 98.73%
2	丙酮/乙酸乙酯 沉淀-在室温下 干燥*	164	-95.6	结晶	N/A
3	丙酮/乙酸乙酯 沉淀-在 55-60°C下干燥	166	-97.8	结晶	100°C时 100.0% 153°C时 99.98%
4	从丙酮中重结 晶	166	-107.2	结晶	100°C时 100.2% 153°C时 100.2%
5	从异丙醇中重 结晶	166	-102.6	结晶	100°C时 100.0% 153°C时

[0281]

					100.0%
7	丙酮/乙酸乙酯 沉淀	166	-99.4	结晶 **	100°C时 100.1% 153°C时 99.91%
8	丙酮沉淀	165	-100.7	结晶 **	100°C时 100.0% 153°C时 100.0%
9	短暂回流下的 丙酮沉淀	165	-100.2	结晶 **	

[0282] \*:DSC温谱图中包含一些游离碱。

[0283] \*\*:这些批次包含从棒状、片状变为针状、棒状和不规则形的特性。

[0284] 式(I)半酒石酸盐的晶型也用多种溶剂通过缓慢蒸发、缓慢冷却、快速冷却和抗溶剂沉淀来制备。

[0285] 缓慢蒸发法。称重样品(通常为20mg)用等分试样的测试溶剂处理。等分试样通常为100–200μL。在添加溶剂间隙,混合物进行振摇或超声。当固体溶解时,根据肉眼检查判断,使溶剂在环境条件下在覆盖有用针孔穿孔的铝箔的开放式小瓶中蒸发。从这些实验基于添加以获得透明溶液的总溶剂来评估溶解度。

[0286] 表2:式(I)半酒石酸盐在室温下(20–25°C)的近似溶解度

[0287]

有机溶剂	近似溶解度(mg/mL)
庚烷	不可得
己烷	不可得
甲苯	<5
二氯甲烷	100
乙醇	29
异丙醇	<5
乙腈	<5
乙酸乙酯	<5
甲醇	>200

[0288]

丙酮	<5
甲基叔丁基醚(TBME)	<5
对二噁烷	<5
四氢呋喃(THF)	<5

[0289] 表3:采用缓慢蒸发法的多态性概要

[0290]

有机溶剂	由缓慢蒸发产生的固体形式	DSC 熔点(℃) 焓 (J/g)		显微镜	TGA
甲醇	否	N/A	N/A	N/A	N/A
乙醇	是	165	-95.0	结晶 **	100℃时 100.0% 150℃时 100.0%

[0291] \*\*:颗粒为片状和棒状

[0292] 缓慢/快速冷却法。在50–60℃下将式(I)半酒石酸盐溶于测试溶剂中。然后使所得溶液冷却到环境温度(缓慢冷却)。如果一天后没有形成固体,将小瓶置于冰箱中。对于快速冷却实验,则使所得溶液在冰箱中冷却。所述固体通过过滤收集并空气干燥。

[0293] 表4:采用缓慢冷却法的多态性概要

[0294]

有机溶剂	由缓慢冷却产生的固体形式	DSC 熔点(℃) 焓 (J/g)		显微镜	TGA
乙醇	是	167	-106.2	结晶 **	100℃时 100.1% 150℃时 100.1%

[0295] \*\*:颗粒为片状和棒状

[0296] 表5:采用快速冷却法的多态性概要

[0297]

有机溶剂	由快速冷却产生的固体形式	DSC 熔点(℃) 焓 (J/g)		显微镜	TGA
乙醇	是	167	-106.2	结晶 **	100℃时 100.0% 150℃时 100.0%

[0298]

	固体形式				
乙醇	是	167	-106.2	结晶 **	100℃时 100.0% 150℃时 100.0%

[0299] \*\*:颗粒为片状和棒状

[0300] 抗溶剂法。将式(I)半酒石酸盐溶于溶剂中。将抗溶剂添加至该溶液。所形成的固

体通过过滤收集并空气干燥。

[0301] 表6:采用抗溶剂法的多态性筛选概要

[0302]

有机溶剂	由抗溶剂法产生的固体形式	DSC		显微镜	TGA
		熔点(°C)	焓 (J/g)		
甲醇/乙酸乙酯	是	167	-99.5	结晶*	100°C时 100.1% 150°C时 100.1%
甲醇/丙酮	是	167	-106.2	结晶*	100°C时 100.3% 150°C时 100.2%
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	是	167	-102.0	结晶*	100°C时 100.2% 150°C时 100.1%
甲醇/对二噁烷	否	N/A	N/A	N/A	N/A
水/THF	否	N/A	N/A	N/A	N/A
水/	否	N/A	N/A	N/A	N/A

[0303]

TM BE					
水/异丙醇	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	结晶**	100°C时 100.0% 150°C时 99.99%
二氯甲烷/乙酸乙酯	是	167	-97.8	结晶*	100°C时 100.2% 150°C时 100.1%
二氯甲烷/甲苯	是	164	-89.8	结晶*	100°C时 99.95% 150°C时 99.86%
二氯甲烷/TBME	是	167	-98.6	结晶**	100°C时 100.0% 150°C时 99.91%
二氯甲烷/对二噁烷	是 (少量)	N/A	N/A	N/A	N/A
二氯甲烷/异丙醇	否	N/A	N/A	N/A	N/A

[0304] :颗粒为片状和棒状

[0305] \*\*:个别颗粒具有一种以上bifrigence色。

[0306] \*\*\*:颗粒为针状和棒状。

[0307] 实施例3:式(I)半酒石酸盐的物理性质

[0308] 差示扫描量热法(DSC)。DSC数据在采用氮气作为吹扫气体的TA Q100仪器上收集。精密称量约2-5mg样品到铝DSC锅中。所述锅覆盖有用镊子穿孔的盖子。样品室在30°C下平

衡并以每分钟10°C的速度加热至220°C的最终温度。

[0309] 热台显微镜。热台显微镜采用设置在配用于图像收集的索尼 DXC-970MD 3CCD 照相机的Leica DM LP显微镜上的Linkam热台 (model FTIR 600) 来进行。用40x物镜和偏振光观察样品。各样品置于两层盖玻片之间。当热台加热时,各样品可目视观察到。采用Links 2.27 版(Linkam) 获得图像。采用USP熔点标准校准热台。

[0310] 证实了在DSC曲线中观察到的吸热转变是通过热台显微镜在 160–163°C的熔化转变。

[0311] 实施例4:式 (I) 半酒石酸盐的X射线粉末衍射

[0312] 所有的X射线粉末衍射 (XRPD) 分析在SSCI公司进行 (West Lafayette, IN 47906)。XPRD分析采用XRD-6000X射线粉末衍射仪采用 Cu K $\alpha$ 辐射进行。该仪器配有细焦点X射线管。管电压和电流强度分别设置为40kV和40mA。发散和散射狭缝设置为1°且接收狭缝设置为 0.15mm。衍射辐射采用NaI闪烁检测器检测。采用以3°/min (0.4秒/0.02°步) 从2.5至40° 2θ的θ-2θ连续扫描。分析硅标准从而检查仪器校直。收集数据并采用XRD-6000v 4.1分析。

[0313] 实施例5:式 (I) 半酒石酸盐与式 (I) 游离碱的比较

[0314] 游离碱和半酒石酸盐的固体表征概括于表7。式I半酒石酸盐较之式I游离碱具有更优异的性质。例如,式I半酒石酸盐较之式I游离碱具有更高的熔点 (>150°C)、更高的充填能(更大的吸热焓)、较小的粒径差异、更高的水溶性(在水中大于300mg/mL)、合适的晶形和更高的体积密度。

[0315] 表7:固态式 (I) 游离碱和式 (I) 半酒石酸盐的物理和化学性质概要

[0316]

物理特性	式(I)游离碱	式(I)半酒石酸盐
熔点(°C)	86-88	163
吸热焓(J/g)	75-82	96-106
粒径(μm)	<10 至 100	~3 (平均)

[0317]

水溶性(mg/mL)	0.04	>216
结晶	是	是
晶形	针状	片状、棒状、有些不规则
吸湿性(40°C/75 % RH)	无	无
体积密度	~0.2	0.4-0.5

[0318] 实施例6:体外活性和特异性

[0319] 式 (I) 半酒石酸盐在体外抑制鞘糖脂的活性。两种试验用于量化式 (I) 半酒石酸

盐对葡糖神经酰胺合酶的抑制活性。由于葡糖神经酰胺是鞘糖脂生物合成的第一和速率限制步骤,测定GM1和GM3的细胞表面水平的流式细胞计试验用于间接评估抑制剂在完整细胞中的活性。K562或 B16/F10细胞和渐增量的式(I)半酒石酸盐(0.6-1000nM)一起培养72小时导致GM1和GM3的细胞表面水平的剂量依赖性降低。抑制K562细胞中的GM1细胞表面呈递的平均IC<sub>50</sub>值是24nM(范围为14-34nM)(表8),且抑制B16/F10细胞中的GM3细胞表面呈递的平均IC<sub>50</sub>值是29nM(范围为12-48nM)。即使以最高剂量测试时,任何一个细胞系中没有观察到明显的细胞毒性。

[0320] 用于活性的选择性试验测定人细胞来源的微粒体中葡糖神经酰胺合酶的抑制。在该试验中,由人黑素瘤A375细胞通过超声和离心作用制备微粒体。微粒体制剂用荧光性神经酰胺底物(NBD-C6-神经酰胺)、UDP-葡萄糖和渐增量的式(I)半酒石酸盐(0-1000nM)在室温下培养一小时。培养后,分离荧光性标记的葡糖神经酰胺和未反应的神经酰胺并通过反相HPLC和荧光检测测定。该试验中抑制葡糖神经酰胺合成的IC<sub>50</sub>值为20到40nM。该值类似于GM1和GM3的上述获得的值,提示这些细胞表面糖脂的测定是式(I)半酒石酸盐对于葡糖神经酰胺合酶的活性的良好替代。

[0321] 通过式(I)半酒石酸盐抑制底物合成的特异性。式(I)半酒石酸盐的特异性在一系列体外基于细胞和无细胞试验中评价。肠内糖苷酶在大鼠组织匀浆中分析(参见Andersson等人,Biochem.Pharm.59(2000)821-829,其全部教导以引用方式合并于此),且糖原脱支酶在所描述的无细胞试验中分析(参见Andersson等人,Biochem.Pharm.67(2004)697-705,其全部教导以引用方式合并于此)。在高达2500μM的浓度下没有发现肠内糖苷酶(乳糖酶、麦芽糖酶、蔗糖酶)、α-葡萄糖苷酶I和II以及细胞溶质脱支酶(α-1,6-葡萄糖苷酶)的可检测的抑制(表8)。

[0322] 非-溶酶体葡糖神经酰胺酶和溶酶体葡糖脑苷脂酶在完整的人细胞中采用C<sub>6</sub>-NBD-葡糖神经酰胺作为底物来分析(参见H.S.Overkleef等人,J.Biol.Chem.273(1998)26522-26527,其全部教导以引用方式合并于此)。牛弥菜醇β环氧化物(溶酶体葡糖脑苷脂酶的特异性抑制剂)用于区分溶酶体和非溶酶体活性。葡糖脑苷脂酶活性也通过荧光-激活细胞分选(FACS)来测定。在1μM 5-(五氟苯甲酰基氨基)-荧光素二-β-D-葡萄糖苷(PFB-FDGLu,Molecular Probes/Invitrogen.Carlsbad,CA)存在下使K562细胞与渐增量的式(I)半酒石酸盐培养30-60分钟。细胞立即在冰上冷却并如上测定荧光。非溶酶体葡糖神经酰胺酶被微弱抑制,其中IC<sub>50</sub>为1600μM。直到2500μM的最高浓度,溶酶体葡糖脑苷脂酶(戈谢病缺乏的酶)没有抑制(表8)。因此,与所测试的任何其他酶相比,需要大约40000倍的浓度差异来抑制葡糖神经酰胺合酶。

[0323] 表8:式(I)半酒石酸盐体外生化活性

[0324]

底物抑制功效(体外IC <sub>50</sub> ) :	~0.024μM
酶特异性,IC <sub>50</sub> :	
α-葡萄糖苷酶I和II:	>2500μM
溶酶体葡糖脑苷脂酶(GBA1) :	>2500μM
非溶酶体葡糖神经酰胺酶(GBA2) :	1600μM
糖原脱支酶:	>2500μM

酶特异性, $K_i$ :	
蔗糖酶抑制:	10 $\mu$ M无抑制
麦芽糖酶抑制:	10 $\mu$ M无抑制

[0325] 实施例7: 小鼠模型中溶酶体葡糖神经酰胺水平的改进管理

[0326] A. 法夫里病。

[0327] 为确定酶替代治疗 (ERT) 和减少底物治疗 (SRT) 的联合使用是否可以维持酶减量 (debulking) 或提供额外利益, 比较了法夫里病小鼠模型 (法夫里-Rag) 中单独和联合治疗的相对功效。亲本法夫里小鼠在Wang, AM等人, Am. J. Hum. Genet. 59: A208 (1996) 中描述。法夫里-Rag与Rag-1小鼠杂交并且不生长成熟淋巴细胞或T细胞 (免疫-减弱)。

[0328] 动物研究。

[0329] 对于单一治疗研究, 法夫里小鼠在1个月大时 (预防模型) 开始研究。处理组接受式 (I) 半酒石酸盐 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) 作为颗粒饲料饮食成分。所述药物以 0.15% (w/w) 配制入标准5053小鼠饲料 (TestDiet, Richmond, IN) 并且不限量提供。该制剂每天为25g小鼠提供 300mg/kg的式 (I) 半酒石酸盐。

[0330] 对于联合治疗研究, 法夫里-Rag小鼠在3个月大时 (处理模型) 开始研究。组A小鼠以每2个月1mg/kg的剂量 (即3、5、7和9个月大) 通过静脉内注射接受重组人 $\alpha$ -半乳糖苷酶A (Genzyme Corp.)。组B接受相同的静脉内酶剂量加之它接受式 (I) 半酒石酸盐 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) 作为颗粒饲料饮食成分。所述药物以0.15% (w/w) 配制入标准5053小鼠饲料 (TestDiet, Richmond, IN) 并且不限量提供。该制剂每天为25g小鼠提供300mg/kg的式 (I) 半酒石酸盐。组C每4个月 (即3和7个月大) 接受酶注射剂并接受和组B相同的含药物饲料饮食。组D仅接受 (和组 B和C相同的) 含药物饲料饮食。群E是未经处理的法夫里-Rag小鼠, 以及组F是野生型对照。参见图10。

[0331] 组织球形三酰神经酰胺 (GL-3, Gb3) 水平的定量

[0332] GL-3的定量通过基本上用于GL-1的Tandem Mass光谱测定法进行。

[0333] 热板试验如之前所述进行 (Ziegler, RJ等人Molec. Ther. 15 (3), 492-500 (2007))。

[0334] 结果

[0335] 用式 (I) 半酒石酸盐单一治疗法夫里小鼠

[0336] 在由 $\alpha$ -半乳糖苷酶A活性缺乏所引起的法夫里病的小鼠模型中评价 SRT。用式 (I) 半酒石酸盐的治疗从一个月大的法夫里小鼠开始并持续直到该小鼠长到一岁。在动物每天的饮食中给予300mg/kg的式 (I) 半酒石酸盐。每两月一次进行小鼠的行为测试 (即热板试验) 和生物化学试验 (即尿分析和组织/血液/尿中的GL-3水平分析)。

[0337] 如图7所示, 在11个月期间内将式 (I) 半酒石酸盐给予法夫里-Rag 小鼠使得机体器官 (肝、肾、心和脾) 中的球形三酰神经酰胺 (GL-3) 的溶酶体积聚速率降低了大约50%。这转化为疾病进展的延迟, 通过较晚表现对令人厌恶的热刺激不敏感 (参见图8) 和阻止尿分析因子例如尿体积、肌酐和钠水平的恶化 (参见图9) 来证实。因此, 式 (I) 半酒石酸盐介导的催化鞘糖脂合成第一步的葡糖神经酰胺合酶的抑制不仅在戈谢病动物模型中有利, 而且在法夫里病动物模型中有利, 且也能在其他鞘糖脂中具有正面效应。

[0338] 用 $\alpha$ -半乳糖苷酶A和式 (I) 半酒石酸盐联合治疗法夫里小鼠

[0339] 单独使用ERT以及采用式 (I) 半酒石酸盐和SRT联合的功效在五群法夫里-Rag小鼠

(n=12个/组)中评价。从三个月大开始,小鼠接受行为测试(即热板试验)和生物化学试验(即组织/血液/尿中的GL-3水平分析)的时间表,如图10所示。在接受ERT的小鼠中,如图10所示按时间表给予1mg/kg剂量的α-半乳糖苷酶A。在接受SRT的小鼠中,在小鼠饮食中每日给予300mg/kg剂量的式(I)半酒石酸盐。

[0340] 如图11所示,ERT降低法夫里-Rag小鼠的血液GL-3水平,而SRT不降低。如图12所示,联合ERT/SRT能最有效地降低法夫里-Rag小鼠肝和肾中血液GL-3水平。如图13所示,SRT降低法夫里-Rag小鼠的尿GL-3水平,而ERT不降低。如图14所示,SRT但不是ERT延迟法夫里-Rag小鼠的热不敏感发作。

[0341] 总之,用法布瑞酶和式(I)半酒石酸盐联合处理法夫里-Rag小鼠比在处理模型中单独采用ERT或SRT以下列方式显示疾病标志物的改善:用联合治疗时肝和肾GL-3积聚显著降低;SRT组中尿GL-3改善;ERT组中血液GL-3改善;以及SRT组中周围神经病延迟。

[0342] B. 戈谢病。

[0343] 为确定酶替代治疗(ERT)和减少底物治疗(SRT)的顺次使用是否可以提供额外利益,比较了戈谢病小鼠模型(D409V/基因敲除)中单独和顺次治疗的相对功效。

[0344] 方法

[0345] 动物研究。涉及动物的程序由Genzyme公司的机构动物管理与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)根据由实验动物评估和认可管理委员会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)所发行的指南来评价和批准。戈谢小鼠(D409V/基因敲除)是在肝、脾和肺显示葡糖神经酰胺积聚的1型戈谢病模型,但其缺乏骨或脑病理学(参见Y-H. Xu等人,Am.J.Pathol.163, 2003, 2093-2101,其全部教导以引用方式合于此)。如之前实验从三个月大开始研究两种性别的动物,显示雄性和雌性之间对于重组葡糖脑苷脂酶或式(I)半酒石酸盐的响应没有差异。该研究采用6组小鼠,其中组A在2周后处死,以提供组织葡糖神经酰胺的基线水平。组B、C和D都经由尾静脉静脉内接受重组人葡糖脑苷脂酶(Genzyme Corp., Cambridge, MA) (10mg/kg)注射剂(100μL),每两天一次,总共8次。组B在该疗法结束时处死(与组A同时),以提供组织葡糖神经酰胺的酶降低水平。组D和E都喂以式(I)半酒石酸盐(Genzyme Corp., Cambridge, MA)作为颗粒饲料饮食成分。所述药物以0.075% (w/w)配制入标准5053小鼠饲料(TestDiet, Richmond, IN)并且不限量提供。该制剂每天为25g小鼠提供150mg/kg的式(I)半酒石酸盐。组F不接受处理并与组C、D和E一起在研究开始后12周处死。食物消耗和小鼠体重每周监控三次从而确定药物摄入以及药物对总体健康的潜在影响。动物通过吸入二氧化碳处死并立即收集其组织。各组织的一半在干冰上快速冷冻并储存在-80 °C直到进行进一步处理。处理另一半用于组织学分析。

[0346] 组织葡糖神经酰胺水平的定量。通过之前描述的质谱学来量化(参见K. McEachern, 等人, J. Gene. Med. 8 (2006) 719-729; T. Doering, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11038-11045, 两者的全部教导以引用方式合于此)。已知重量的组织在2:1 (v/v)氯仿:甲醇中匀化并在37°C下培养15分钟。离心样品并在4°C下用0.2倍体积的水萃取上清液过夜。离心样品,弃去水相,有机相在氮气下干燥成膜。对于电喷射离子化质谱(ESI/MS)分析,组织样品在1mL的氯仿:甲醇(2:1, v/v)中重组为等量的50ng初始组织重量并涡流5分钟。将各样品的等分试样(40μL)转移至Waters总回收率小瓶并添加50μL的10μg/mL d3-C16-GL-1内

标 (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA)。样品在氮气下干燥并用200 $\mu$ L的1:4 (v/v) DMSO: 甲醇重组。不同碳链长度的葡糖神经酰胺的ESI/MS分析在与配有电喷射离子源的Micromass Quattro微系统偶联的Waters alliance HPLC (Separation Module 2695) 上进行。在45°C下将脂质提取物样品 (20 $\mu$ L) 注射在C8柱 (4mL X 3mm i.d; Phenomenex, Torrance, CA) 上并以50到 100% 乙腈的梯度 (2mM醋酸铵, 0.1% 甲酸) 以0.5mL/min洗脱。第一个 0.5分钟保持为50% 有机物, 然后在最后3.5分钟快速转变为100%。源温度恒定保持在150°C且氮气以670L/h的流速用作脱溶气体。毛细管电压保持在3.80KV, 其中锥孔电压为23V, 同时各离子类型的停留时间为 100ms。通过MRM方式获得谱图以监控八个主要的异构体 (C16:0、C18:0、C20:0、C22:1、C22:0、C22:1-OH、C24:1和C24:0)。葡糖神经酰胺的定量基于这八个异构体相对于内标的总和, 其中校准曲线为0.1 到10 $\mu$ g/mL。

[0347] 组织学。对于组织学分析, 在室温下使组织在锌福尔马林 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 中固定24小时, 然后在4°C下储存在 PBS中直到进行进一步处理。所有样品在乙醇中脱水、在二甲苯中洗净、渗透并埋入Surgipath R石蜡 (Surgipath, Richmond, IL) 中。采用转动切片机切下五微米的切片, 在60°C下干燥然后染色。切片在 Hemo-De (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) 中脱石蜡并在浓度下降的乙醇中再水化, 然后用PBS洗涤。所述切片用苏木精和曙红 (H&E) 染色并采用大鼠抗-小鼠CD68单克隆抗体 (Serotec, Raleigh, NC) 标记, 以识别巨噬细胞。在PBS中洗涤5分钟后, 玻片在乙醇中脱水并在Hemo-De中洗净, 然后用SHUR/Mount<sup>TM</sup>盖片固定介质 (TBS, Durham, NC) 固定。肝中 CD68免疫阳性的百分比面积采用MetaMorph (MDS Analytical Technologies, Toronto, Canada) 分析十个400X图像/组织切片来量化。不了解组别设计的经过委员会认证的兽医病理学家检查所有切片。

#### [0348] 结果

[0349] 用于减量三个月大的戈谢小鼠肝、脾和肺中积聚的GL1的葡糖脑苷脂酶剂量法。为研究单一治疗和酶治疗或减少底物治疗的联合的相对优点, 首先测定最大限度地耗尽戈谢小鼠脏器中的GL1水平的酶法。三个月大的戈谢小鼠 (D409V/基因敲除) 静脉内给予2、4或8剂10mg/kg的重组人葡糖脑苷脂酶。用2或4剂酶处理的小鼠每三天接受药物滴注, 而用8剂处理的小鼠每两天接受酶。设计接受8次处理的动物的滴注之间使用较短的时间间隔, 从而使给予的人酶的任何免疫反应的潜在影响最小化。最后一次酶滴注后7天处死动物, 并测定其肝、脾和肺中残留GL1 的量。

[0350] 用2剂葡糖脑苷脂酶处理使肝GL1水平降低50%。将酶滴注次数增加到4或8次, 正如所料, 肝GL1水平降低了很大程度 (大约75%)。即使采用8剂也不能完全降低GL1水平, 这与显示仅在延长期治疗后肝脾肿大减少的戈谢受试者中的经验一致 (参见G.A.Grabowski, 等人, Ann. Int. Med. 122 (1995) 33-39, 其全部教导以引用方式合并不此)。戈谢小鼠脾中底物水平更加耐受酶处理。与未经处理对照相比, 给予2剂葡糖脑苷脂酶不能显著改变GL1水平。将酶滴注次数增加到4或8次使得脾 GL1水平降低约50%。在肺中, 8剂后观察到未经处理对照的大约60%的降低。肺中底物减少的几乎可忽略的较低程度可能是由于滴注的酶到脂质负载的肺泡巨噬细胞的差的可及性。当与脾和肺相比时, 在肝中观察到较大的GL1清除率可能反映全身滴注后酶的生物分布 (参见S.M. Van Patten, 等人. Glycobiology 17 (2007) 467-478, 其全部教导以引用方式合并不此)。基于这些结果, 由每两天给药一次的

10mg/kg葡萄糖脑苷脂酶的8次连续剂量组成的处理方法用于随后的研究。

[0351] 酶和减少底物治疗降低戈谢小鼠肝GL1水平的相对能力。一组三个月大的戈谢小鼠单独或顺次用重组葡萄糖脑苷脂酶或式(I)半酒石酸盐处理。组B、C和D小鼠如同上述给予8剂酶(在两周的时间)以清除积聚的GL1。然后不同的组以常规饲料或包含式(I)半酒石酸盐(150mg/kg/天)的饲料饲养,再饲养10周,其中组F不接受处理,作为空白对照(*naïve control*)。不管饲料配方,小鼠食用相当量的食物且体重增加中不存在可辨别的差异。单独的酶治疗2周后,大约80%的贮积GL1水平从肝中清除。当使这些动物不经进一步处理发展10周,它们的肝GL1水平增加,表明在干预期间发生底物的再积聚(图2,C柱)。这些水平与未经处理对照的水平没有显著不同(图2,F柱)。然而,如果小鼠用酶处理,然后用其食物中的式(I)半酒石酸盐处理10周时间,它们的肝GL1水平显著低于未经处理的对照(图2,D&F柱)。该结果表明用式(I)半酒石酸盐进一步处理降低底物的再积聚。有趣的是,在整个研究期间(12周)期间仅用式(I)半酒石酸盐处理的戈谢小鼠与未经处理的年龄匹配对照小鼠(图2,F柱)相比也显示GL-1水平降低(图2,E柱),尽管差异不明显。仅SRT降低该动物模型GL1水平的能力与我们之前的报告一致(参见 K.A.McEachern,等人,Mol.Genet.Metab.91(2007)259-267,其全部教导以引用方式合并于此),并可能反映戈谢小鼠(D409V/基因敲除)保持残留的酶活性的事实(参见Y-H.Xu,等人,Am.J.Pathol.163,2003, 2093-2101,其全部教导以引用方式合并于此)。

[0352] 酶和减少底物治疗降低戈谢小鼠脾GL1水平的相对能力。三个月大的戈谢小鼠仅用重组葡萄糖脑苷脂酶处理2周使得脾GL1水平降低大约 60% (图3,B柱)。当使这些动物不经进一步干预再成熟10周时,底物水平恢复到研究开始时所观察到的水平(图3,C柱),且与未经处理对照没有显著差异(图3,F柱)。这表明脾GL1再积聚速度高于肝。这种推测也通过脾中底物的基础水平(~1500mg/g组织;图2;A柱)高于肝(~500 mg/g组织;图3,A柱)的观察来支持。用酶然后用式(I)半酒石酸盐再处理10周的动物的脾GL1水平最大程度地降低(图3,D柱)且这些水平显著低于未经处理的对照脾的水平(图3,F柱)。这表明利用SRT不仅延迟底物的再积聚而且能进一步降低该器官的贮积负担。似乎至少在这种情况下,残余内源酶和底物减少的净作用导致总体底物水平的进一步下降。仅用式(I)半酒石酸盐处理12周的小鼠的脾GL1水平(图3,E柱)低于未经处理对照(图3,F柱)与这种观点一致,尽管差异不明显。因此,在具有高度残余酶活性的轻微戈谢1型患者中,用ERT然后用SRT治疗可能可以促进不利底物的清除速度,也许甚至是促进不利底物的清除程度。

[0353] 酶和减少底物治疗降低戈谢小鼠肺GL1水平的相对能力。如之前所述,肺GL1水平通过静脉内给予重组葡萄糖脑苷脂酶而清除的效果最差。三个月大的戈谢小鼠用酶处理2周仅导致肺底物水平降低30% (图4,B 柱)。正如所料,用正常饲料再饲养10周的一组动物显示GL1的再积聚,且与未经处理的水平没有明显差异(图4,C&F柱)。相反,在相同干预时间内用含有式(I)半酒石酸盐的饲料饲养的动物显示底物水平的降低低于仅给予酶的水平(图4,D柱),且显著低于未经处理对照的水平(图4, F柱)。这再一次提示在肺中,如同在脾中,式(I)半酒石酸盐(在残余内源酶活性存在下)的净作用不仅延迟GL1的再积聚而且能使其进一步降低,从而低于起始水平。如同在其他内脏器官中,当与未经处理对照相比(图 4,F 柱),仅通过式(I)半酒石酸盐处理能有效降低肺GL1水平(图4,E 柱)。

[0354] 酶和减少底物处理后戈谢小鼠肝的组织病理学分析。为设想不同治疗方法对肝的

作用,组织切片用CD68(一种巨噬细胞标志物)染色。未经处理的三个月大的戈谢小鼠肝切片的分析显示存在大量的脂质充盈的、CD68-阳性的戈谢细胞,其在12周后分析时在很大程度上保持不变。与上述生化数据一致,在2周时期内给予重组葡萄糖脑苷脂酶的动物肝脏显示这些异常巨噬细胞中的脂质基本上清除。如果使这些动物不经进一步处理再成熟10周,由戈谢细胞的再次出现表明GL1的再积聚迹象。然而,如果在相同的干预期间内用式(I)半酒石酸盐给予小鼠减少底物治疗,则戈谢细胞不增加。如之前所述,仅接受式(I)半酒石酸盐的戈谢小鼠也显示底物积聚减少,尽管程度与接收ERT和SRT联合的小鼠不一样。各种切片上CD68-阳性染色的程度也采用MetaMorph软件量化(图5)。这些切片的染色程度反映出生化测定的肝GL1水平的量(图15),进一步支持不同处理方法的相对优点的建议。

[0355] 实施例8:式(I)半酒石酸盐对戈谢病小鼠模型的功效

[0356] 动物研究。涉及动物的程序由机构动物管理与使用委员会(IACUC)根据由实验动物评估和认可管理委员会(AAALAC)、国家和联邦指南来评价和批准。使戈谢<sup>D409V/基因敲除</sup>小鼠(参见Y.-H.Xu.等人,Am.J.Pathol.163(2003)2093-2101,其全部教导以引用方式合并于此)按照研究要求成熟。雄性和雌性之间没有发现对式(I)半酒石酸盐的表型或响应的差异,因此两种性别均用于该研究。式(I)半酒石酸盐通过每日一次经口灌胃法以10mL/kg的体积递送。开始处理之前用相似体积的水经口灌胃一周使动物适应。将式(I)半酒石酸盐溶于注射用水(WFI;VWR,West Chester,PA)并在九天时期内以从75mg/kg/天增加到150mg/kg/天的剂量给予,其中三天采用各剂量且增量为25mg/kg/天。小鼠每周称重三次以监控药物对其总体健康的潜在影响。动物通过吸入二氧化碳处死并立即收集其组织。各组织的一半在干冰上快速冷冻并储存在-80°C直到进行进一步处理。收集另一半用于组织学分析。

[0357] 通过高效薄层色谱定量组织葡萄糖神经酰胺水平。高效薄层色谱(HP-TLC)分析如(A.Abe,等人,J.Clin.Inv.105(2000)1563-1571;H.Zhao,等人.Diabetes 56(2007)1341-1349;和S.P.F.Miller,等.J.Lab.Clin.Med.127(1996)353-358,各自的全部教导以引用方式合并于此)所述。简言之,通过在冷PBS中匀化获得总脂质部分,以2:1(v/v)氯仿:甲醇萃取并在水浴超声发生器中超声。离心样品以分离两相并回收上清液。沉淀在氯仿:甲醇:盐水中再超声、离心且收集所得第二部分上清液并与第一部分上清液合并。用1:1(v/v)氯仿:盐水混合物帮助合并上清液、涡流并离心。丢弃上层水层后,添加甲醇:盐水,涡流并再离心。收集有机相并在氮气下干燥,以每0.1g原始组织重量1mL的浓度溶于2:1(v/v)氯仿:甲醇并储存在-20°C。

[0358] 一部分脂质提取物用于测定总磷酸盐(参见B.N.Ames,Methods Enzymol.8(1966)115-118,其全部教导以引用方式合并于此),即,磷脂含量用作内标。其余经历碱性甲醇醇解以移除在HP-TLC板上和葡萄糖神经酰胺一起移动的磷脂。将含有等当量总磷酸盐的提取物的等分试样和已知的葡萄糖神经酰胺标准(Matreya inc.Pleasant Gap,PA)一起点在HP-TLC板上。脂质用3%乙酸铜一水合物(w/v)、15%磷酸(v/v)溶解并显示,然后在150°C下烘干10分钟。在比重计(GS-700,Bio-Rad,Hercules,CA)上扫描脂质带并通过Quantity One软件(Bio-Rad)分析。

[0359] 通过质谱定量组织葡萄糖神经酰胺水平。葡萄糖神经酰胺通过如(参见K.McEachern,等人J.Gene Med.8(2006)719-729;T.Doering,等人,J.Biol.Chem.274(1999)11038-11045,各自的全部教导以引用方式合并于此)所述的质谱来量化。组织在2:1(v/v)的氯仿:

甲醇中匀化并在37°C下培养。离心样品并用0.2倍体积的水萃取过夜。再次离心样品，弃去水相，有机相在氮气下干燥成膜。

[0360] 对于电喷射离子化质谱(ESI/MS)分析，组织样品在1ml的氯仿/甲醇(2:1, v/v)中重组为等量的50ng初始组织重量并涡流5分钟。将各样品的等分试样(40μL)转移至Waters总回收率小瓶并添加50μL的10μg/mL d3-C16-GL-1内标(Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA)。样品在氮气下干燥并用200μL的1:4DMSO:甲醇重组。不同碳链长度的葡萄糖神经酰胺的ESI/MS分析在与配有电喷射离子源的Micromass Quattro微系统偶联的Waters alliance HPLC(Separation Module 2695)上进行。在45°C下将二十微升脂质提取物样品注射在C8柱(4mL X 3mm i.d; Phenomenex, Torrance, CA)上并以50-100%乙腈的梯度(2mM醋酸铵, 0.1%甲酸)以0.5 mL/min洗脱。第一个0.5分钟保持为50%有机物，然后在最后3.5分钟快速转变为100%。源温度恒定保持在150°C且氮气以670L/h的流速用作脱溶气体。毛细管电压保持在3.80KV，其中锥孔电压为23V，同时各离子类型的停留时间为100ms。通过MRM方式获得谱图以监控八个主要的异构体(C16:0、C18:0、C20:0、C22:1、C22:0、C22:1-OH、C24:1和C24:0)。葡萄糖神经酰胺的定量基于这八个异构体相对于内标的总和，其中校准曲线为0.1到10μg/mL。

[0361] 组织学。对于组织学分析，在室温下使组织在锌福尔马林(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)中固定24小时，然后在4°C下储存在PBS中直到进行进一步处理。所有样品在浓度升高的乙醇中脱水、在二甲苯中洗净、渗透并埋入Surgipath R石蜡(Surgipath, Richmond, IL)中。采用转动切片机切下五微米的切片，在60°C烘箱中干燥然后染色。切片在二甲苯中脱石蜡，并在浓度下降的乙醇中再水化，然后用水洗涤。在3%乙酸中冲洗1分钟后，玻片在pH 2.0的3%乙酸中的1%Alcian Blue 8GX(Electron Microscopy Sciences)中染色40分钟。在水中冲洗并在1%高碘酸中氧化1分钟后，玻片以Schiff试剂(Surgipath)染色12分钟。在热水中洗涤5分钟后，玻片在乙醇中脱水并在二甲苯中洗净，然后用SHUR/Mount<sup>TM</sup>盖片固定介质(TBS, Durham, NC)固定。采用每10个高倍视野(HPFs, 400x)人工细胞计数来量化肝脏的形态学上识别的戈谢细胞。

### [0362] 结果

[0363] 给药式(I)半酒石酸盐对D409V/基因敲除小鼠的影响。评估给药式(I)半酒石酸盐对D409V/基因敲除小鼠的影响。大约七个月大的小鼠通过经口灌胃法给予150mg/kg/天的式(I)半酒石酸盐(初步研究显示能有效抑制葡萄糖神经酰胺合酶的剂量)10周。该处理对小鼠的总体健康或摄食习性没有明显影响。在整个研究期间测量它们的体重显示与未经处理的小鼠没有明显差异，提示式(I)半酒石酸盐在显示能有效抑制合酶的剂量下是良好耐受的。

[0364] 式(I)半酒石酸盐对处理年幼的、症状前戈谢小鼠的功效。评价式(I)半酒石酸盐消除年幼(10周大)的D409V/基因敲除小鼠中葡萄糖神经酰胺的溶酶体积聚和戈谢细胞出现。这些年幼的戈谢小鼠显示受影响组织中GL-1的低水平。十周大动物通过经口灌胃法给予75或150mg/kg/天的式(I)半酒石酸盐10周。与年龄匹配介质处理的对照相比时，葡萄糖神经酰胺水平的测量显示剂量依赖性降低。在用150mg/kg/天处理的组别中，肝、肺和脾的葡萄糖神经酰胺水平分别是对照水平的60、40和75% (图6)。经处理的D409V/基因敲除小鼠的肝和肺中观察到的统计显著低水平的葡萄糖神经酰胺表明式(I)半酒石酸盐能有效降低鞘糖脂在

这些组织中的积聚。

[0365] 在研究结束时未经处理的D409V/基因敲除小鼠(20周大)肝脏的组织病理学评价显示整个肝脏中戈谢细胞的存在。用150mg/kg/天的式(I)半酒石酸盐处理10周的小鼠仅显示戈谢细胞的偶尔存在,且所述细胞大小还总是在变小。许多不同的切片中这些细胞的定量证实经式(I)半酒石酸盐处理的小鼠中戈谢细胞的频率显著降低。同样,这些生化和组织检查所见提示每日将给药式(I)半酒石酸盐给予症状前戈谢小鼠能有效减少受影响组织中葡糖神经酰胺的积聚以及随后肝脏中戈谢细胞的形成。

[0366] 式(I)半酒石酸盐对处理有预先存在病理的年老戈谢小鼠的功效。也评价式(I)半酒石酸盐在阻止或逆反年老有症状的戈谢小鼠的疾病进展中的功效。七个月大的D409V/基因敲除小鼠通过经口灌胃法给予75或150mg/kg/天的式(I)半酒石酸盐10周。处理5和10周后经处理小鼠的肝、肺和脾中葡糖神经酰胺水平的分析显示除研究开始时观察到的水平外没有增加。处理10周后,与介质处理小鼠相比,葡糖神经酰胺水平测定为肝中降低60%、肺中降低50%和脾中降低40%。这些结果显示式(I)半酒石酸盐能有效抑制具有贮积病理的已有负担的小鼠中葡糖神经酰胺的进一步积聚。

[0367] 组织切片的组织病理分析显示与未经处理的对照相比,经处理的D409V/基因敲除小鼠肝中戈谢细胞数目减少。戈谢细胞数目的定量证实了生化发现:经处理的D409V/基因敲除小鼠的戈谢细胞计数明显不同于处理开始时5周和10周时间点的细胞计数。这些时间点的戈谢细胞数均明显低于未经处理的D409V/基因敲除小鼠。同样,这些数据表明式(I)半酒石酸盐能有效抑制具有预先存在病理的动物中葡糖神经酰胺的进一步积聚和戈谢细胞的发育。

[0368] 讨论

[0369] 式(I)半酒石酸盐显示对于酶葡糖神经酰胺合酶的高度特异性。有效剂量对葡糖脑苷脂酶活性没有可测量的抑制,当治疗1型戈谢病患者时,这是一个重要的特征,因为大多数患者保持残余的葡糖脑苷脂酶活性。在150mg/kg/天的有效剂量,没有可观察到的胃肠道问题,且在处理组和对照未处理组之间没有体重差异。IC<sub>50</sub> (24-40nM) 或高于IC<sub>50</sub> (24-40 nM) 的血清浓度容易地以低于最大耐受水平的口服剂量获得。式(I)半酒石酸盐也容易代谢并清除:母体化合物和代谢物均在24小时内有效清除,如大鼠和狗中采用<sup>14</sup>C-放射性标记化合物的单次或重复口服剂量ADME研究所示。

[0370] 采用单次每日经口灌胃的非优化剂量法成功地抑制了年幼的症状前小鼠和已经显示贮积病理的年老戈谢小鼠中葡糖神经酰胺的积聚。年幼的10周大小鼠,尽管相对于野生型对照具有升高的葡糖神经酰胺水平,还没有发展特征的充盈组织巨噬细胞(称为戈谢细胞)。用150mg/kg/天的式(I)半酒石酸盐处理阻止了所有可测量的疾病发展并抑制了戈谢细胞的生长。在显示高水平溶酶体葡糖神经酰胺和戈谢细胞数目的年老小鼠中,处理5周或10周后鞘糖脂水平或贮积细胞数目没有进一步增加。由于据报导戈谢细胞中主要的葡糖神经酰胺来源是来源于胞外的,这些结果暗示式(I)半酒石酸盐对葡糖神经酰胺合酶的抑制是全身的。

[0371] 式(I)半酒石酸盐有效抑制葡糖神经酰胺的进一步积聚的观察提示可以进一步增强戈谢病的治疗的治疗学策略。

[0372] 总之,本发明提出的数据表明式(I)半酒石酸盐是葡糖神经酰胺合酶的活性和特

异性抑制剂,其在戈谢病小鼠模型中未显示明显的副作用。它通过抑制葡糖神经酰胺积聚和戈谢细胞形成成功地阻止了症状前和年老患病戈谢小鼠的疾病进展。这些发现提示式(I)半酒石酸盐可以代表用于儿科和成人1型戈谢病以及可能的其他鞘糖脂贮积疾病的又一个治疗学选择。

[0373] 实施例9:式(I)半酒石酸盐的2期临床试验

[0374] 方法。每日两次经口给予50或100mg式(I)半酒石酸盐的该临床试验治疗5个国家7个地区的26名患有1型戈谢病(GD1)的成人(16F:10M;平均年龄为34岁,从18-60岁;均为白种人)。患者具有脾肿大(正常体积的10倍)和血小板缺乏(血小板45,000-100,000/mm<sup>3</sup>)或贫血(血色素8-10g/dl;女性;8-11g/dl,男性)。之前的12个月中没有人接受酶替代或减少底物治疗。治疗52周后复合主要功效终点是球蛋白水平(+0.5g/dl)或血小板计数(+15%)。也评价肝体积、壳三糖酶、葡糖神经酰胺。患者继续治疗并长期监控。

[0375] 结果。第52周高达20名患者的数据是有效的;其他4名提前退出且2名继续进行。20名患者中的19名满足复合主要终点。第52周与基线相比的平均(1SD)变化是:血色素+1.6(11.35)g/dL;血小板计数+43.6% (137.59%);脾和肝体积(正常倍数)分别为40.2% (110.44%)和15.8% (110.39%);以及壳三糖酶49.9% (120.75%)。所有患者4周后血浆葡糖神经酰胺水平正常化,式(I)半酒石酸盐是良好耐受的且具有可接受的安全曲线。6名患者中七种相关不良反应报告为相关;所有反应在性质上均是温和且短暂的。

[0376] 实施例10:式(I)半酒石酸盐药物组合物,100mg胶囊

[0377] 制备100mg胶囊的方法:式(I)半酒石酸盐、微晶纤维素、乳糖一水合物和羟丙甲纤维素,E15各自通过20目网筛。显示于表9的含量的过筛组分在高切变制粒机中混合九到十二分钟。

[0378] 表9:100mg胶囊的药物制剂

[0379]

组分	单位量		
	单位量 100mg 胶囊(mg)	%每单 位剂量 (% w/w)	名义批量: 71,000 个胶 囊总量 19.2 kg
式(I)半酒石酸盐	100.0	37.0	7.1
微晶纤维素	45.0	16.7	3.2
乳糖一水合物	111.5	41.3	7.9
羟丙甲纤维素, E15	10.8	4.0	0.8
山嵛酸甘油酯	2.7	1.0	0.2
填充重量(mg)	270		248-292 mg
组合物总%		100.0	19.2 kg

[0380] 然后所述组分通过向制粒机盘中添加纯水(2.2kg;11.7%的组分干重) 直到如目

视证实完成从而颗粒化。湿颗粒从盘中移除，并通过旋转叶轮、筛分磨。然后湿颗粒在直接加热的固定的固体床的托盘烘箱中在50±5 °C下干燥，使得含水量不超过3.5%，如工艺间检查所证实。然后干颗粒通过筛选磨且过筛颗粒转移至V型混合机中。将山嵛酸甘油酯(0.2kg)添加至V型混合机中，混合最终混合物直到混合物均匀(在线或线外混合均匀性测试所测定)，通常为10-20分钟。然后最终混合物用半自动胶囊填充机包封入2#尺寸胶囊至适当的填充重量(平均270mg)，且填充的胶囊在包装前除尘。

[0381] 实施例11A:式(I)半酒石酸盐药物组合物,10mg胶囊

[0382] 制备10mg胶囊的方法：按照实施例10的过程直到包封步骤。为制备10mg胶囊，最终混合物用胶囊填充机包封入4#或5#尺寸胶囊至适当的填充重量(平均27mg)，且填充的胶囊在包装前除尘。

[0383] 实施例11B:式(I)半酒石酸盐药物组合物,50mg胶囊

[0384] 制备50mg胶囊的方法：按照实施例10的过程直到包封步骤。为制备50mg胶囊，最终混合物用胶囊填充机包封入3#尺寸胶囊至适当的填充重量(平均135mg)，且填充的胶囊在包装前除尘。

[0385] 实施例11C:式(I)半酒石酸盐药物组合物,150mg胶囊

[0386] 制备150mg胶囊的方法：按照实施例10的过程直到包封步骤。为制备150mg胶囊，最终混合物用胶囊填充机包封入0#尺寸胶囊至适当的填充重量(平均405mg)，且填充的胶囊在包装前除尘。

[0387] 实施例12:式(I)半酒石酸盐药物组合物,25mg胶囊

[0388] 制备25mg胶囊的方法：按照实施例10的过程直到包封步骤。为制备25mg胶囊，最终混合物用胶囊填充机包封入4#尺寸胶囊至适当的填充重量(平均67.5mg)，且填充的胶囊在包装前除尘。

[0389] 实施例13:式(I)半酒石酸盐药物相互作用-CYP2D6抑制剂

[0390] 进行研究来评价在给予或不给予帕罗西汀(30mg,每日一次,一种CYP2D6的有效抑制剂)的情况下口服多次剂量的式(I)半酒石酸盐(100mg BID)的药代动力学、安全性和耐受性。这是在36名健康受试者(17名男性和19名女性)中进行的开放标记、固定顺序式研究。第二目的是评价健康受试者中帕罗西汀与多次剂量的式(I)半酒石酸盐(100mg BID)联合的PK以及进一步评价与单剂量式(I)半酒石酸盐给药相比，多次剂量后式(I)半酒石酸盐PK。

[0391] 存在于血浆中的式(I)半酒石酸盐的游离碱的平均PK参数是非线性的，并且与单剂量给药相比，重复给药(100mg BID)显示出AUC和C<sub>max</sub>的2倍积聚。与仅多次剂量给药式(I)半酒石酸盐相比，同时给药式(I)半酒石酸盐和帕罗西汀导致C<sub>max</sub>增加7倍以及AUC增加9倍。这些结果表明帕罗西汀可抑制式(I)半酒石酸盐的代谢并增加药物的血浆浓度。可预期使用其他有效CYP2D6抑制剂(例如氟苯丙胺和奎尼丁)的类似效果，当式(I)半酒石酸盐和已知是有效CYP2D6抑制剂的药物联合给药时，小心监控药物血浆水平和可能的剂量调整是必要的。帕罗西汀浓度比所预期的高约1.5到2倍，这提示式(I)半酒石酸盐或其代谢物之一可能是CYP2D6的温和抑制剂。

[0392] 实施例14:式(I)半酒石酸盐药物相互作用-CYP3A4抑制剂和p-糖蛋白(PGP)抑制剂

[0393] 进行研究来评价健康的男性和女性受试者中在给予或不给予酮康唑(400mg, 每日一次)的情况下多次剂量的式(I)半酒石酸盐(100mg每日两次)的药代动力学、安全性和耐受性。这是在36名健康受试者(18名男性和女性)中进行的开放标记、固定顺序式研究,由三个周期组成,其包括100mg单剂量给予式(I)半酒石酸盐、多剂量给予式(I)半酒石酸盐和同时给予式(I)半酒石酸盐100mg(每日两次)和酮康唑400mg(每日一次)。重复给予式(I)半酒石酸盐、酮康唑(一种细胞色素p4503A4的强抑制剂(“CYP 3A4”))和p-糖蛋白导致以稳定状态存在于血浆中的式(I)半酒石酸盐游离碱的暴露量增加4倍。因此,已经接受式(I)半酒石酸盐的患者可能需要暂时减少剂量,而同时用CYP 3A4的强抑制剂或p-糖蛋白治疗。

[0394] 实施例15:式(I)半酒石酸盐制剂的稳定性研究

[0395] 在闪烁小瓶中通过混合式(I)半酒石酸盐和赋形剂(胶囊级的乳糖一水合物、Avicel PH 301(微晶纤维素)和Methocel E15Prem LV(羟丙甲纤维素)来制备大约两克规模的混合物。将15.6%的水添加至混合物中并混合以形成湿颗粒。采用#10筛(开口为2000微米)筛选湿颗粒。然后过筛颗粒在50℃烘箱中干燥2小时。采用#18筛(开口为1000微米)筛选干燥颗粒。将润滑剂、山嵛酸甘油酯添加至混合物并混合以形成最终混合物。所制备混合物显示于下表:

[0396] 表

[0397]

批号#	AP	乳糖一水合物	Avicel PH 101	50 mg / 100 mg 制剂	注释
1	1	2.1	2.1	50	对照
2	1	2.1	0	50	无 Avicel
3	1	0	2.1	50	无乳糖
4	1	2.1	1.1	50	较少 Avicel
5	1	1.1	2.1	50	较少乳糖
6	1	2.1	0.8	50	Avicel 和乳糖比例相当于 100 mg
7	1	1.1	0.4	100	对照

[0398] Methocel (HPMC) 以2到4%范围使用

[0399] Compritol ATO 88以1到1.6%范围使用

[0400] 具有不同的API:乳糖:Avicel比例的上列七种制剂混合物在高温85℃下暴露3天(强制降解研究条件)从而了解各制剂的降解速率和稳定性。基于50mg药品在24个月的降解产物程度类似于在85℃下暴露3天所获得程度的研究结果来选择加速条件。

[0401] 强制降解研究采用反相梯度HPLC法进行,所述方法使用C18柱(Waters T3, 3μm, 100x 4.6mm),流动相由水和乙腈与0.1%三氟乙酸(TFA)组成,UV检测为280nm,柱温为40℃,以及流速为2mL/min。梯度从保持5%B(乙腈和0.1%TFA)0.5分钟开始,然后以4.83%B/

分钟增加有机组分直到15分钟。

[0402] 总结各制剂混合物的总降解并相对于API:乳糖:Avicel的比率绘图,结果显示于图15中。该研究结果表明当保持API与乳糖的比率不变时,减少Avicel量将改进制剂的稳定性。当去除avicel时,制剂的API:乳糖:avice1比率为1:2.1:0,它是最稳定的制剂。当去除乳糖时,制剂的API: 乳糖:avice1比率为1:0:2.1,且该制剂较之其他比率不是最不稳定的。组合信息表明乳糖能使制剂稳定,而avice1使制剂不稳定。然而,当两种赋形剂都存在时,它们彼此作用。必须调节比率以获得稳定制剂。

[0403] 对于如水溶性的式(I)半酒石酸盐的活性药物组分,在湿法制粒期间微晶纤维素有助于形成颗粒,因为它不溶于水。如果不使用微晶纤维素,将从颗粒阶段急速变为糊状物。糊状物难以操作,且干燥后所得颗粒不具有适当的机械强度和粒径分布。药物组合物具有37wt %的式(I)半酒石酸盐;41.0wt %的水溶性填充剂;16.7wt %的水不溶性填充剂;2wt %到约6wt %的粘合剂;和约0.1wt %到约2wt %的润滑剂,所有组分基于干固体,并且就所形成的降解物的量而言,所述药物组合物具有最佳的稳定性曲线。

[0404] 本发明所引用的所有专利、公开申请和参考资料的教导以引用方式全部合并于此。

[0405] 尽管已经参考其具体实施方式具体显示并描述了本发明,本领域技术人员应理解,可在不脱离所附权利要求所覆盖的范围下进行形式和细节的各种变化。

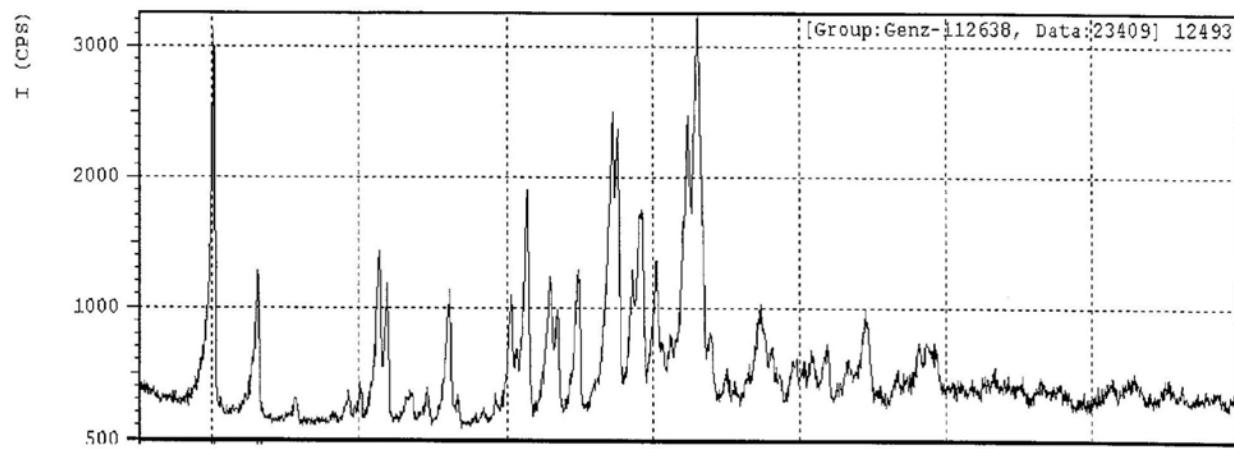


图1

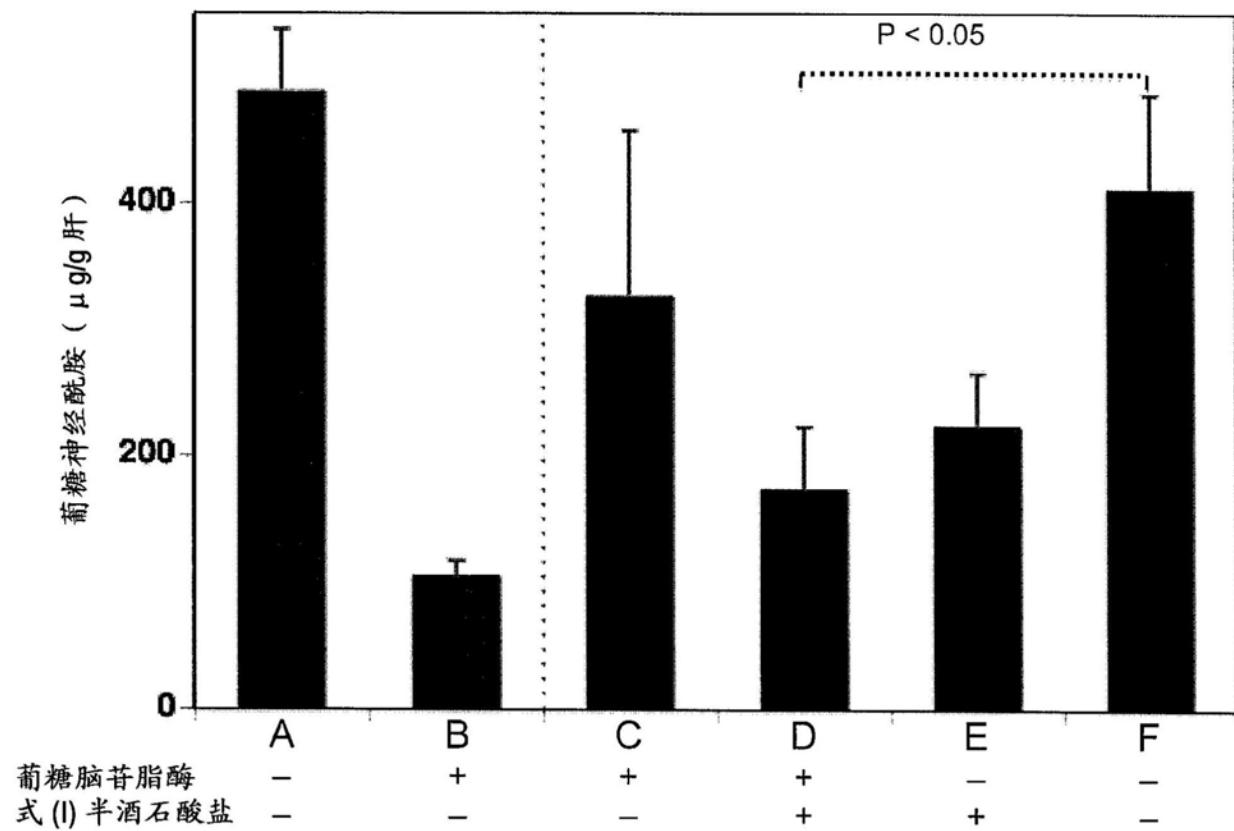


图2

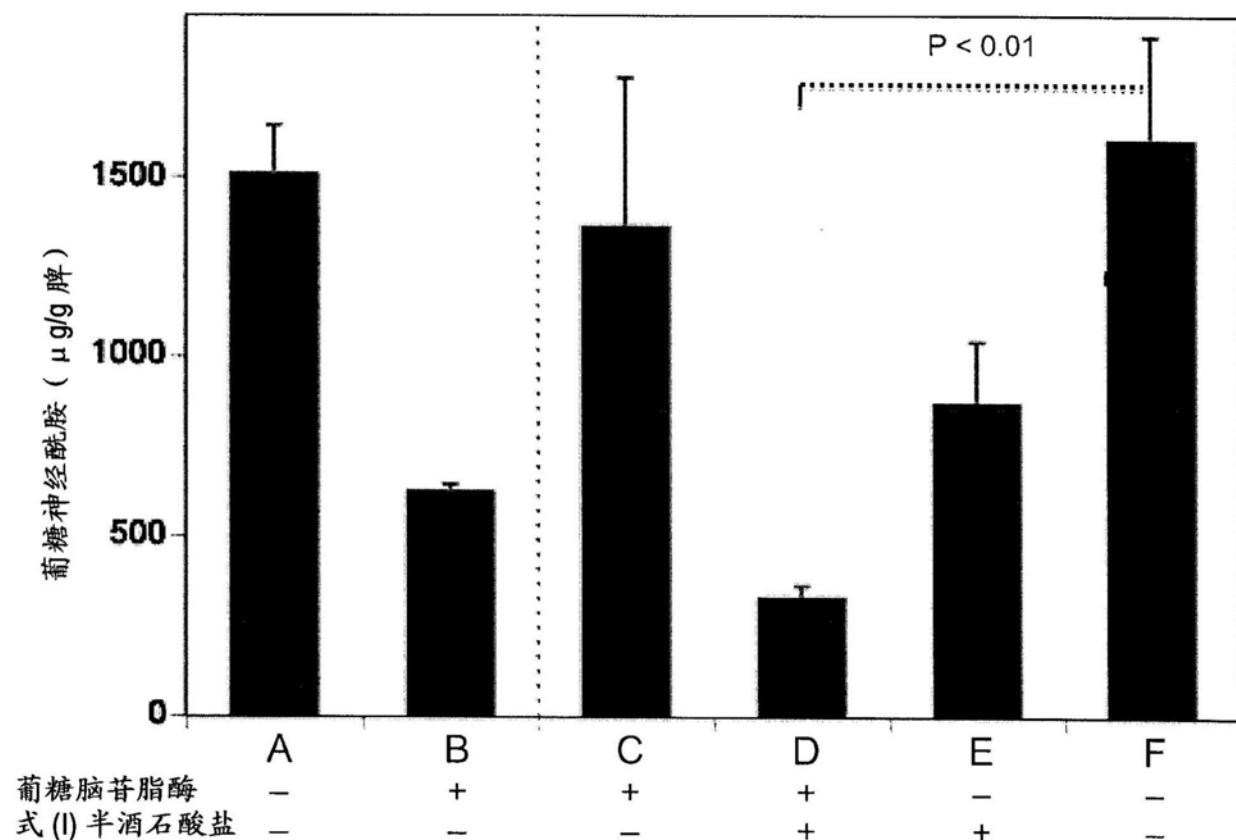


图3

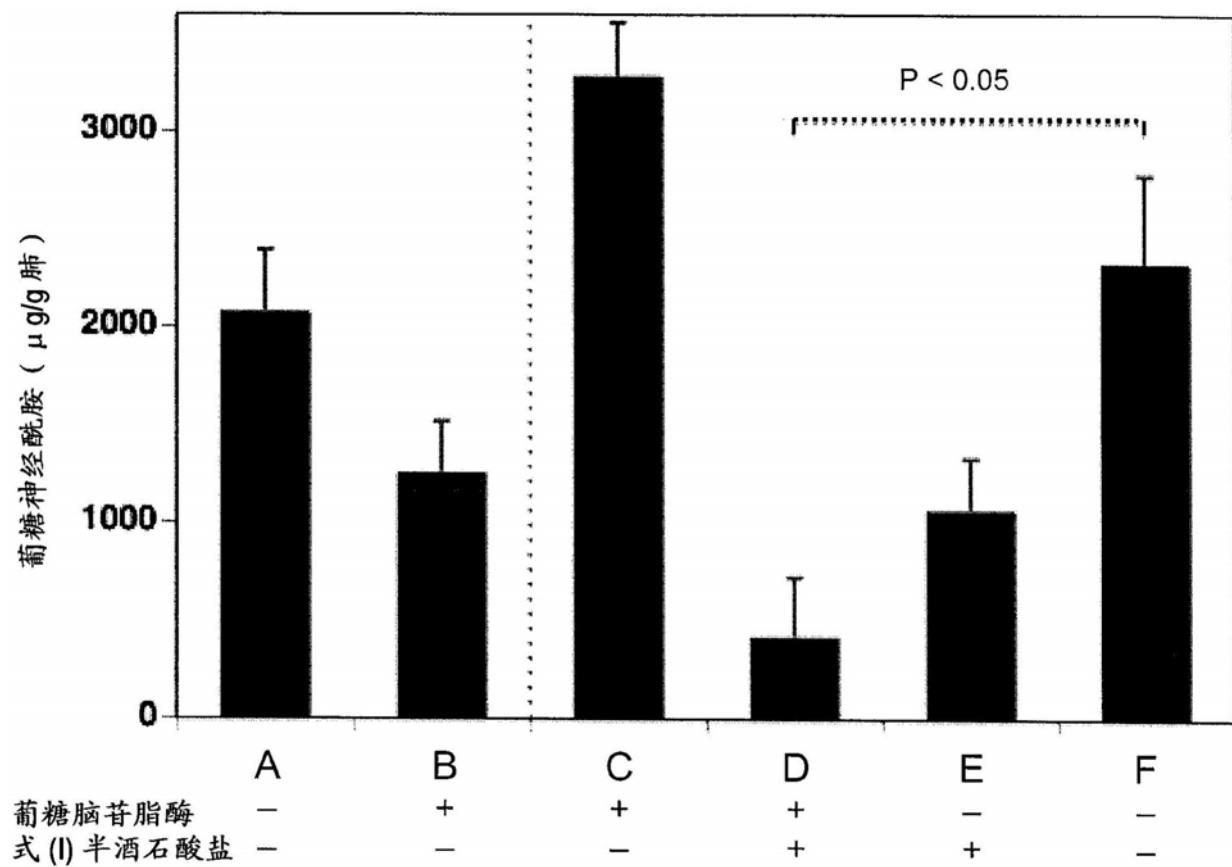


图4

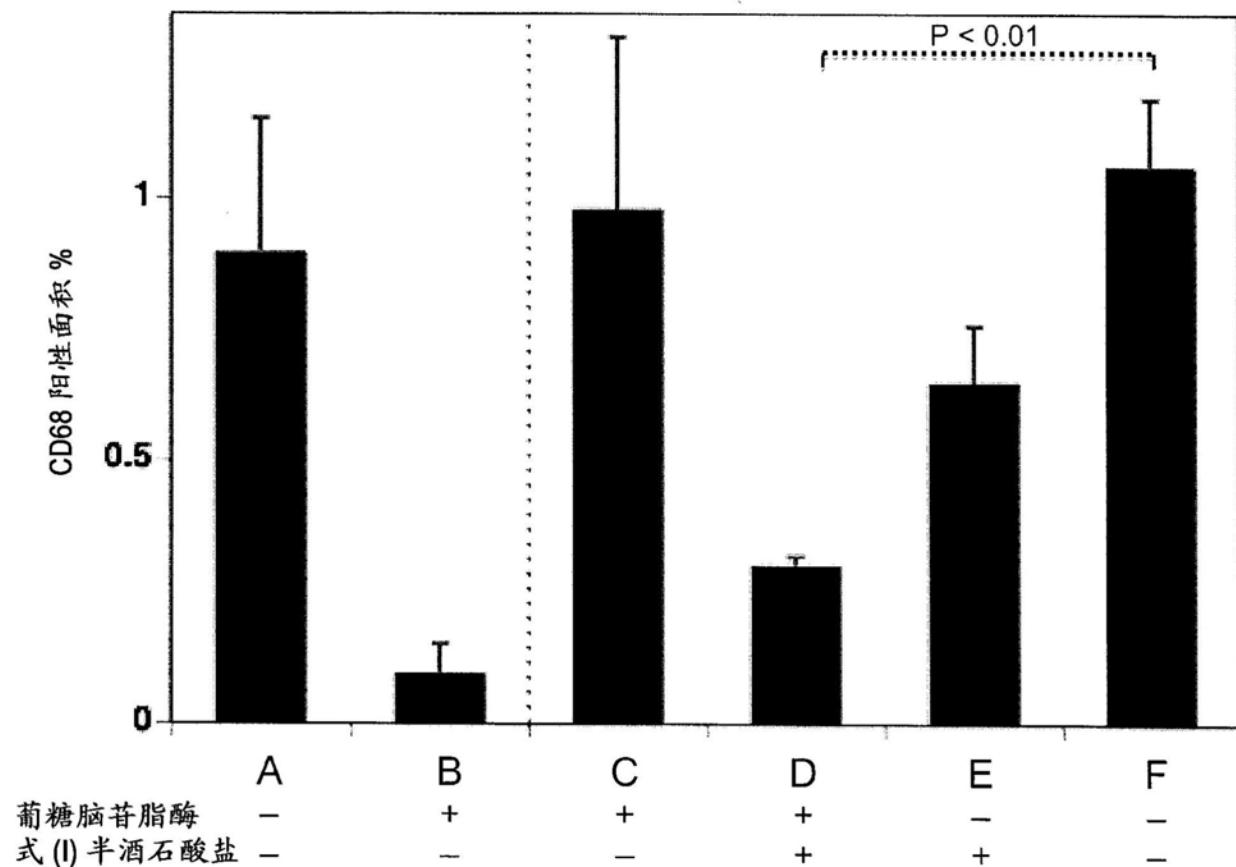


图5

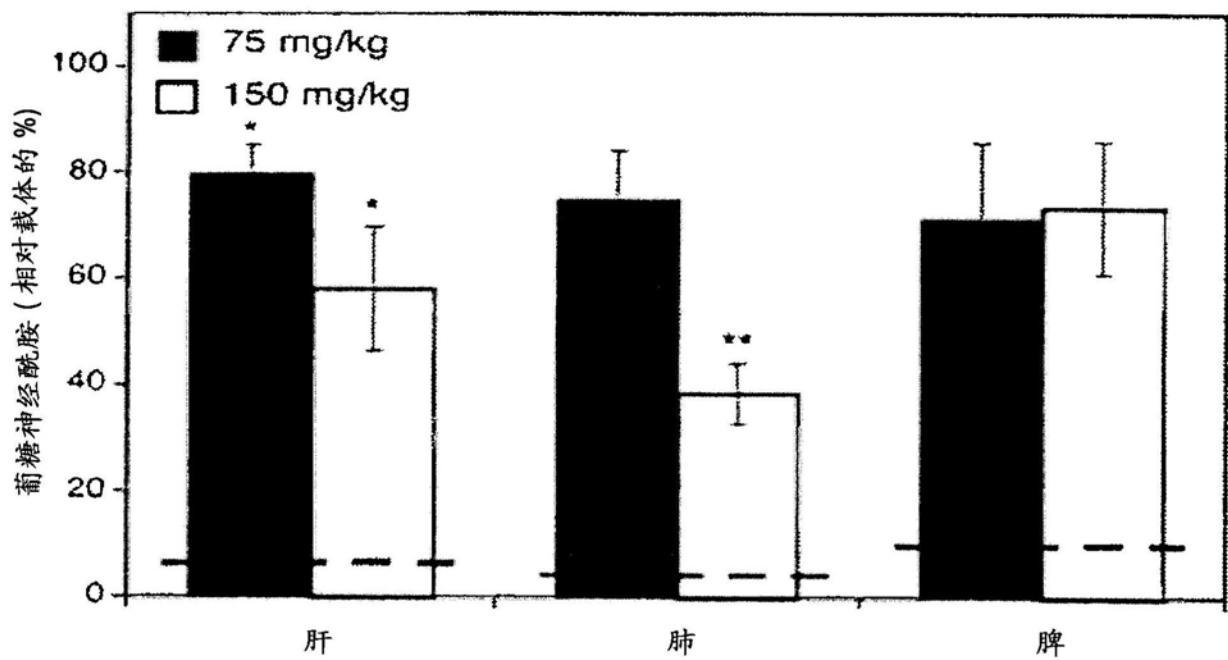


图6

## 式 (I) 半酒石酸盐抑制法布里小鼠中 GL-3 积聚的程度

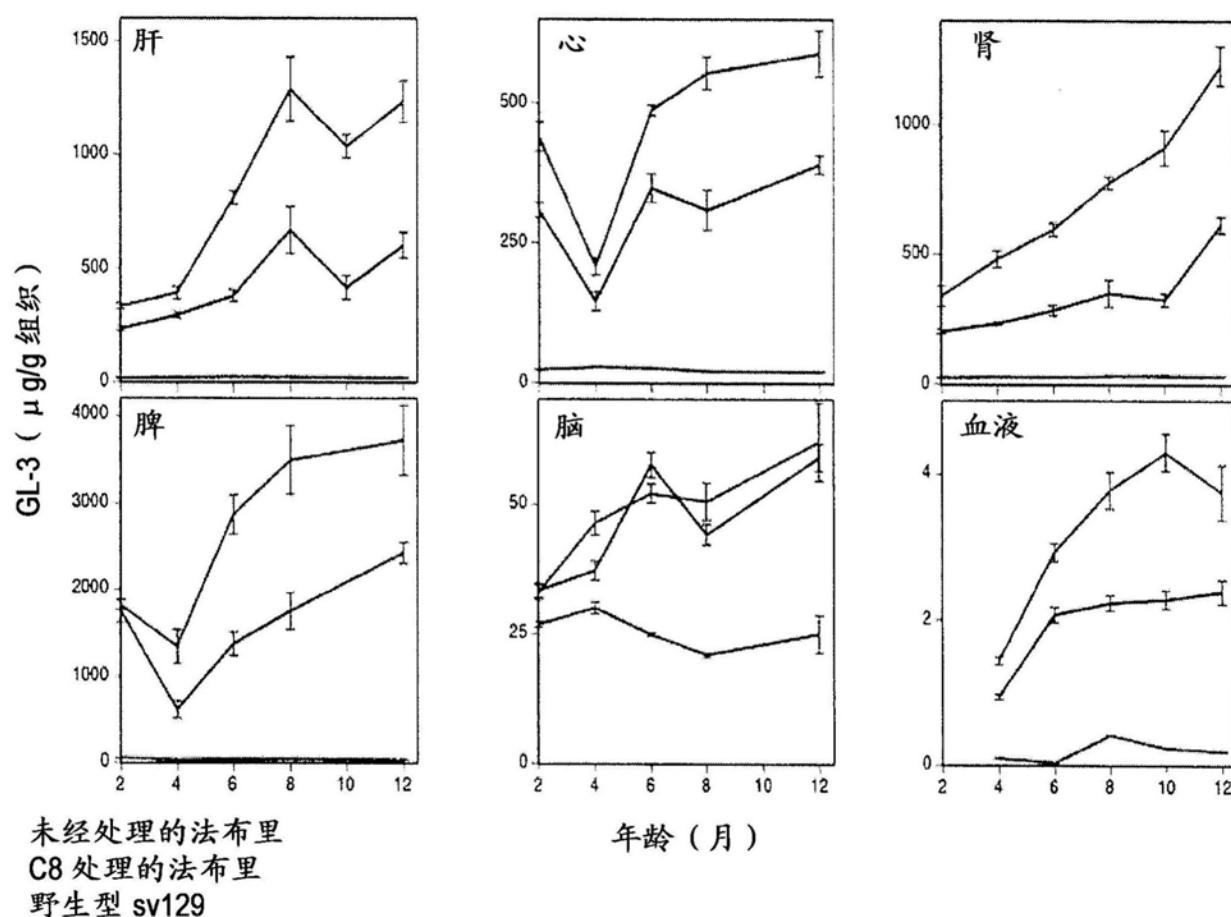


图7

## 式(I)半酒石酸盐延迟法布里小鼠周围神经病的发作和进展

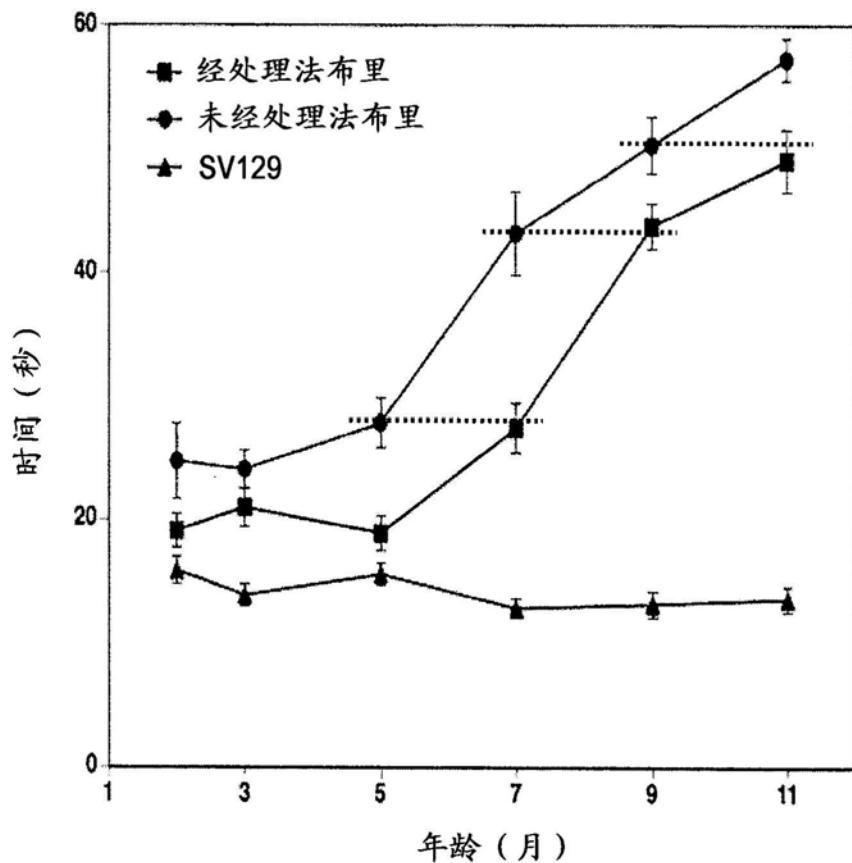


图8

## 用式(I)半酒石酸盐处理法布里小鼠改善一些肾功能标志物

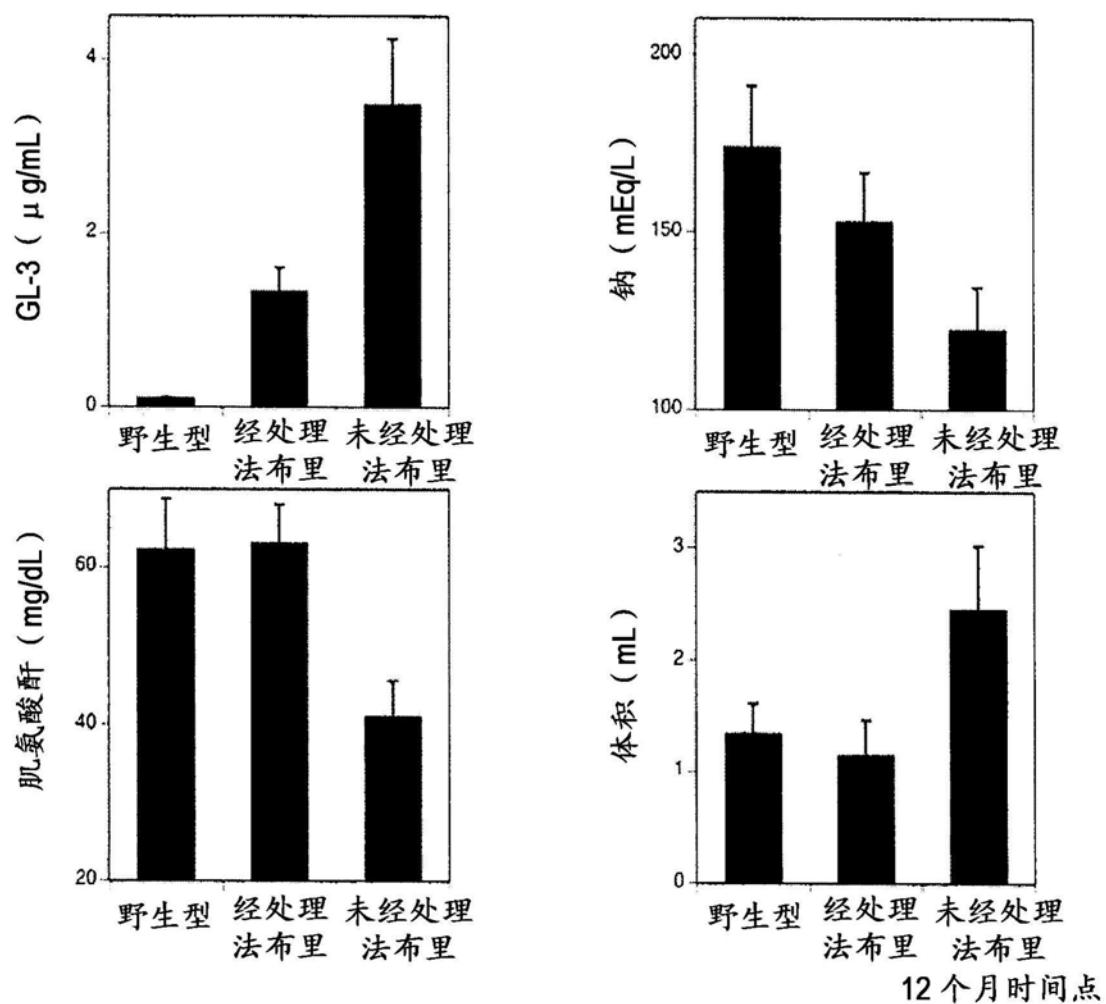


图9

## 法布里小鼠中 ERT ± SRT 研究的时间线

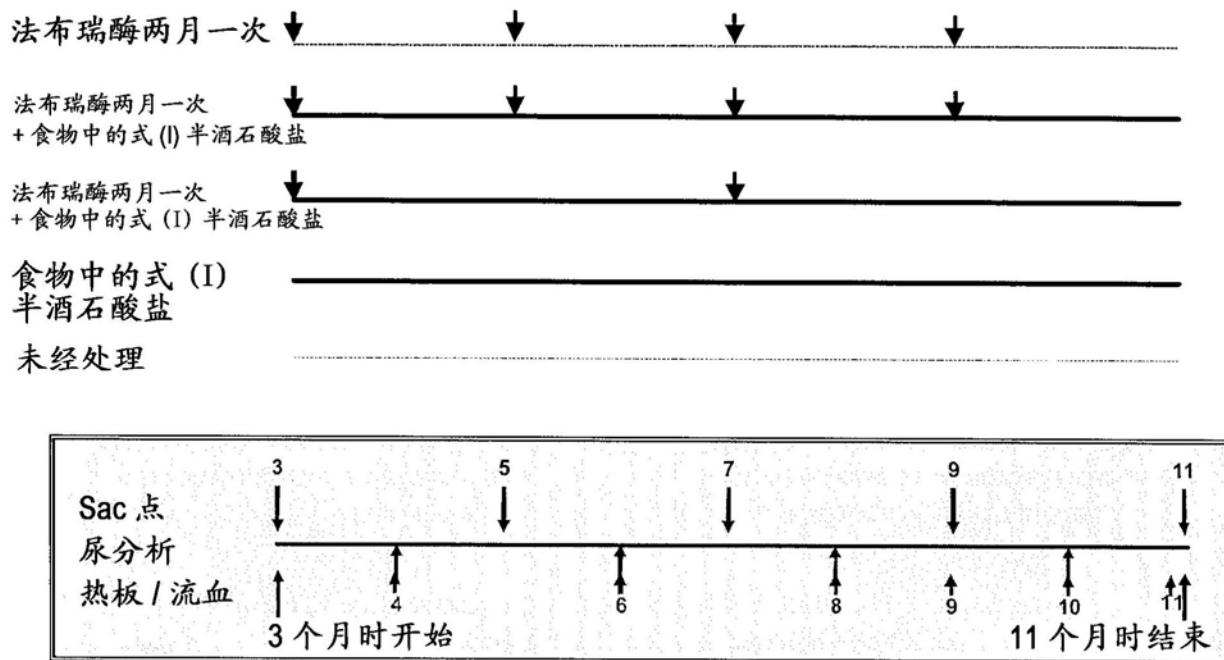


图10

## ERT 但非 SRT 降低法布里 -Rag 小鼠中血 GL-3 水平

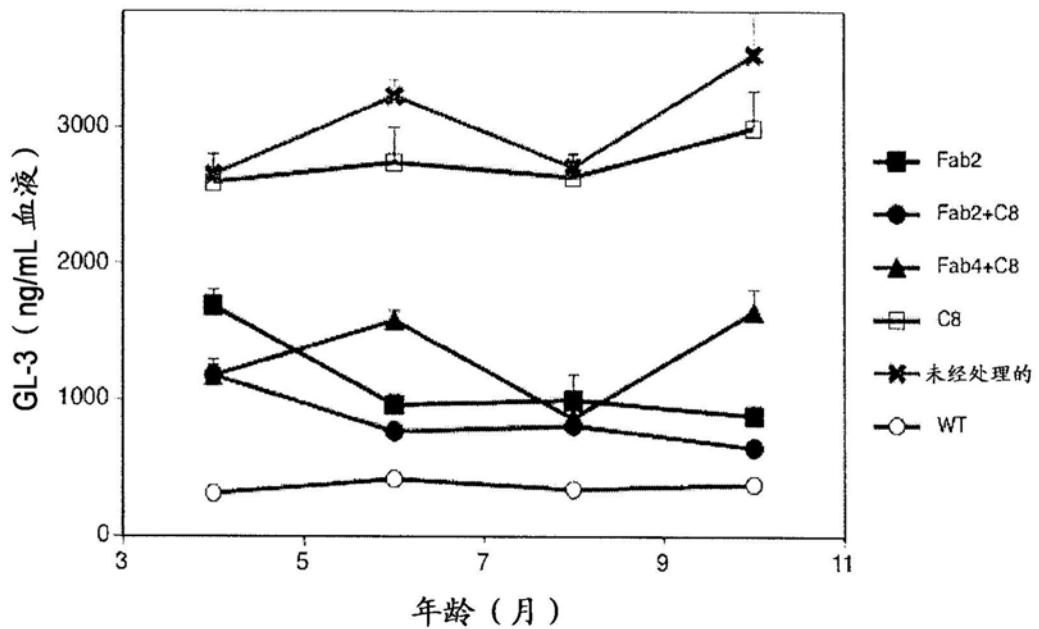


图11

## ERT/SRT 组合能最有效地降低法布里 -Rag 小鼠肝和肾中 GL-3 水平

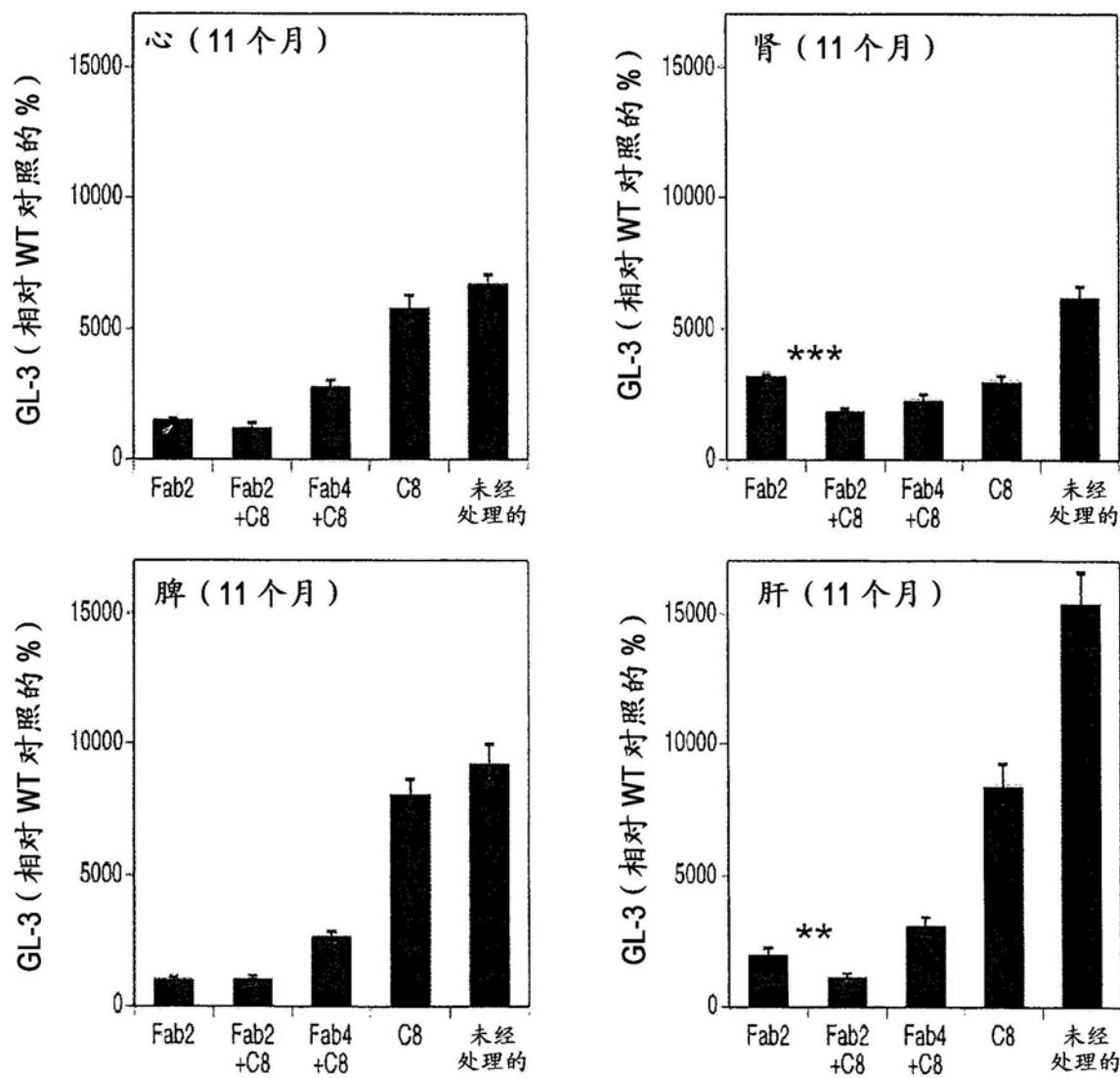


图12

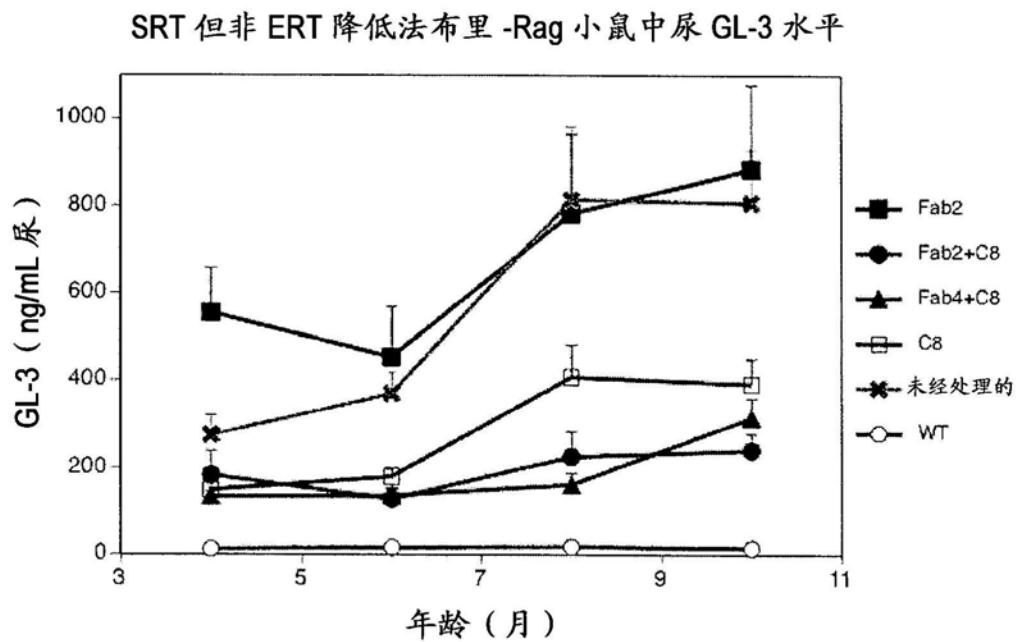


图13

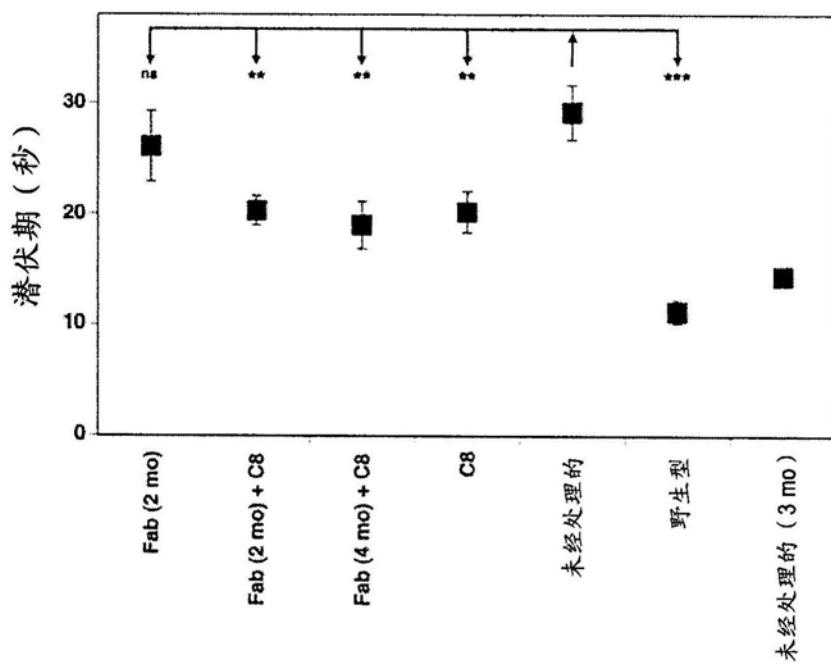
**SRT 但非 ERT 延迟法布里 -Rag 小鼠 (11 个月) 热敏性发作**

图14

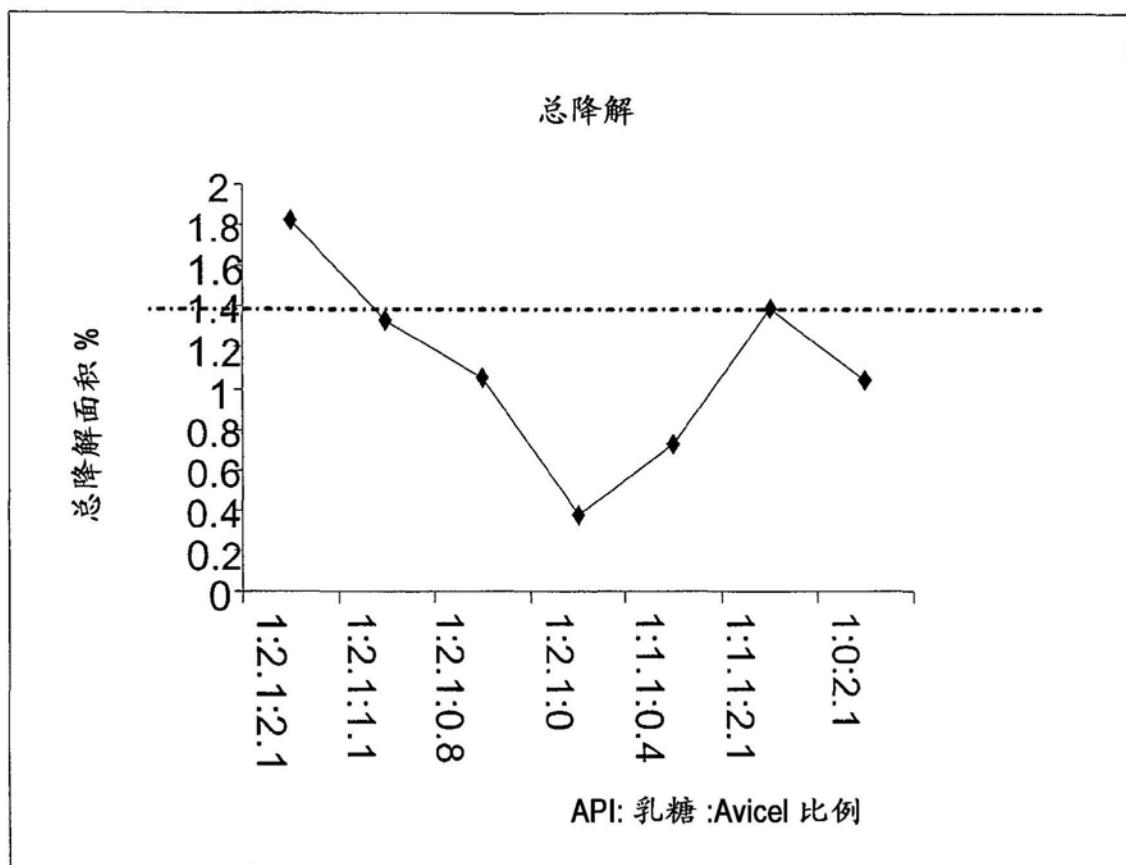


图15