



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105228613 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201480020828. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 12

A61K 31/352(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/763, 630 2013. 02. 12 US

61/837, 743 2013. 06. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/016050 2014. 02. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/127016 EN 2014. 08. 21

(71) 申请人 柯巴斯医药有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·泰珀

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 张福根

权利要求书2页 说明书29页 附图16页

(54) 发明名称

超纯的四氢大麻酚-11-羧酸

(57) 摘要

本发明属于药物化学领域并涉及超纯阿佳酸、其合成、药物组合物以及使用其治疗和 / 或预防炎症、疼痛和纤维化疾病的方法, 该纤维化疾病包括硬皮病、系统性硬化症、硬皮病样病症、无皮肤硬化的硬皮病、肝硬化、间质性肺纤维化、特发性肺纤维化、Dupuytren 挛缩、疤痕疙瘩、慢性肾脏疾病、慢性移植排斥、和其它结疤 / 伤口愈合异常、手术后粘连以及反应性纤维化。

1. 一种包含阿佳酸的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍。

2. 权利要求 1 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 5 倍至约 50 倍。

3. 权利要求 2 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 10 倍至约 40 倍。

4. 权利要求 1 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 97% 的纯度。

5. 权利要求 4 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 98% 的纯度。

6. 权利要求 5 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 99% 的纯度。

7. 一种包含阿佳酸的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB1 受体的 K_i 比对于 CB2 受体的 K_i 高约 2 倍至约 100 倍。

8. 权利要求 7 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB1 受体的 K_i 比对于 CB2 受体的 K_i 高约 5 倍至约 50 倍。

9. 权利要求 8 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB1 受体的 K_i 比对于 CB2 受体的 K_i 高约 20 倍至约 40 倍。

10. 权利要求 7 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 97% 的纯度。

11. 权利要求 10 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 98% 的纯度。

12. 权利要求 11 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 99% 的纯度。

13. 一种包含阿佳酸的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 97% 的纯度。

14. 权利要求 13 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 98% 的纯度。

15. 权利要求 14 所述的组合物,其中所述阿佳酸具有大于约 99% 的纯度。

16. 权利要求 13 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至 100 倍。

17. 权利要求 16 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 5 倍至 50 倍。

18. 权利要求 17 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 20 倍至约 40 倍。

19. 一种包含阿佳酸的组合物,其中所述阿佳酸具有小于约 0.1% (w/w) 的 11- 羟基-(6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ^8 -四氢大麻酚 (HU-210)。

20. 权利要求 19 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍。

21. 权利要求 20 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 5 倍至约 50 倍。

22. 权利要求 21 所述的组合物,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 20 倍至约 40 倍。

23. 一种治疗患有纤维化疾病的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的阿佳酸的步骤,其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述纤维化疾病为皮肤纤维化。

25. 权利要求 24 所述的方法, 其中所述纤维化疾病为肺纤维化。

26. 权利要求 23 所述的方法, 其中所述纤维化疾病选自硬皮病、系统性硬化症、硬皮病样病症、无皮肤硬化的硬皮病、肝硬化、间质性肺纤维化、特发性肺纤维化、Dupuytren 挛缩、疤痕疙瘩、囊性纤维化、慢性肾脏疾病、慢性移植物排斥、和其它结瘢 / 伤口愈合异常、手术后粘连以及反应性纤维化。

27. 权利要求 23 所述的方法, 其中所述阿佳酸经口施用。

28. 权利要求 23 所述的方法, 其中所述阿佳酸经静脉内施用。

29. 权利要求 23 所述的方法, 其中所述阿佳酸经局部施用。

30. 权利要求 23 所述的方法, 其中所述阿佳酸经眼部施用。

31. 权利要求 23 所述的方法, 其中所述阿佳酸经由植入物或贴剂施用。

32. 一种减轻受试者的疼痛的方法, 其包括向所述受试者施用包含阿佳酸的组合物的步骤, 其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍。

33. 权利要求 32 所述的方法, 其中所述疼痛在 11 点疼痛量表上减轻至少 1 个点。

34. 一种减轻受试者的炎症的方法, 其包括向所述受试者施用包含阿佳酸的组合物的步骤, 其中所述阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍。

超纯的四氢大麻酚-11-羧酸

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时申请号 61/763,630(2013 年 2 月 12 日提交)和 61/837,743(2013 年 6 月 21 日提交)的优先权,每一个申请的公开内容以其整体通过引用并入本文中。

发明领域

[0003] 本发明属于药物化学领域,涉及超纯的四氢大麻酚-11-羧酸化合物、其药物组合物以及合成。本发明还涉及使用本发明的化合物和药物组合物以治疗和/或预防各种病况(如炎症、疼痛和纤维化)的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 四氢大麻酚(THC)是大麻的主要精神活性成分。除了改变情绪的作用之外,已报道 THC 表现出其它活性,其中一些可能具有治疗价值,包括镇痛、抗炎和镇吐性质。THC 的潜在治疗价值已导致寻找相关化合物,所述化合物使精神活性作用最小化,同时保留潜在的药用价值活性。

[0006] 例如,(6aR,10aR)-3-(1',1'-二甲基庚基)- Δ^8 -四氢-大麻酚-9-羧酸(IUPAC 命名),也称为阿佳酸(ajulemic acid,AJA),单独地或与其它物质(agents)组合是用于治疗疼痛和炎症的候选物。

[0007] 当前对于大麻素(cannabinoid)在疼痛和炎症方面的研究的知识体系表明,大麻素受体 CB1 和 CB2 在引发和维持与伤害感受、致敏、疼痛信号传递和疼痛处理相关的突触后信号传送和免疫机制中起重要作用。以前,不纯的阿佳酸制剂已显示对于 CB1 和 CB2 受体二者均具有亲和力,并且对于 CB1 受体的亲和力更大(14)。本发明首次提供高度纯化形式的阿佳酸,其显示对于 CB2 受体比对于 CB1 受体具有更高的亲和力。

[0008] 超纯阿佳酸可用于治疗纤维化疾病,如硬皮病(scleroderma)、系统性硬化症(systemic sclerosis)、硬皮病样病症(scleroderma-like disorders)、无皮肤硬化的硬皮病(sine scleroderma)、肝硬化(liver cirrhosis)、间质性肺纤维化(interstitial pulmonary fibrosis)、特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis)、Dupuytren 挛缩(Dupuytren's contracture)、疤痕疙瘩(keloids)、慢性肾脏疾病(chronic kidney disease)、慢性移植物排斥(chronic graft rejection)、器官(如肝、食道、心脏、肺、肠等)的纤维化(fibrosis)、其它结疤/伤口愈合异常(scarring/wound healing abnormalities)、手术后粘连(post-operative adhesions)以及反应性纤维化(reactive fibrosis);以及炎性疾病如狼疮(lupus)、多发性硬化(multiple sclerosis)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、皮肌炎(dermatomyositis)、马方综合征(Marfan's syndrome)、银屑病(psoriasis)、1 型糖尿病(Type 1 diabetes)、糖尿病(diabetes)、癌症(cancer)、哮喘(asthma)、特应性皮炎(atopic dermatitis)、自身免疫甲状腺病症(autoimmune thyroid disorders)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、克罗恩病(Crohn's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's

disease)、HIV 感染 (HIV infection)、中风 (stroke) 和缺血 (ischemia), 其中 CB2 受体的激活在该疾病的病理生理学中起一定作用。

[0009] 概述

[0010] 本发明提供一种包含超纯阿佳酸的组合物, 其中该阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力大于其对于 CB1 受体的亲和力。在一些实施方式中, 超纯阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍、约 5 倍至 50 倍、约 15 倍至 50 倍、约 10 倍至约 40 倍、或约 20 倍至约 40 倍。本发明提供一种包含阿佳酸的组合物, 其中该阿佳酸对于 CB1 受体的 K_i 大于其对于 CB2 受体的 K_i 。在一些实施方式中, 该阿佳酸对于 CB1 受体的 K_i 比其对于 CB2 受体的 K_i 高约 2 倍至约 100 倍、约 5 倍至 50 倍、约 15 倍至 50 倍、约 10 倍至约 40 倍、或约 20 倍至约 40 倍。本发明组合物中的阿佳酸可以具有大于约 97%、大于约 98% 或大于约 99% 的纯度。

[0011] 本发明还提供一种包含阿佳酸的组合物, 其中该阿佳酸的纯度为大于约 97%、大于约 98% 或大于约 99%。

[0012] 本发明还提供一种包含阿佳酸的组合物, 其中该阿佳酸具有小于约 1% (w/w)、小于约 0.5% (w/w)、小于约 0.3% (w/w)、小于约 0.2% (w/w)、小于约 0.1% (w/w) 或小于约 0.05% (w/w) 的 11-羟基-(6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ^8 -四氢大麻酚 (HU-210) 或其它高 CB1 活性的化合物。

[0013] 本发明组合物中的阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力可以大于其对于 CB1 受体的亲和力。在一些实施方式中, 阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比其对于 CB1 受体的亲和力高约五倍至五十倍、约十倍至五十倍、约二十倍至约四十倍。

[0014] 本发明还提供用于治疗患有纤维化疾病的受试者的方法, 该方法包括向受试者施用治疗有效量的阿佳酸, 其中该阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力大于其对于 CB1 受体的亲和力。在一些实施方式中, 阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比其对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍、约 5 倍至 50 倍、约 15 倍至 50 倍、约 10 倍至约 40 倍、或约 20 倍至约 40 倍。纤维化疾病可以为皮肤纤维化 (dermal fibrosis)、肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化、心脏纤维化或任何其它器官的纤维化。纤维化疾病可以为硬皮病、系统性硬化症、硬皮病样病症、无皮肤硬化的硬皮病、肝硬化、间质性肺纤维化、特发性肺纤维化、Dupuytren 挛缩、疤痕疙瘩、囊性纤维化 (cystic fibrosis)、慢性肾脏疾病、慢性移植物排斥、其它结瘢 / 伤口愈合异常、手术后粘连以及反应性纤维化。

[0015] 阿佳酸可以经口施用、经静脉内施用、经局部施用、经眼睛施用、经间质施用、通过吸入施用或者经由植入物或贴剂施用。

[0016] 本申请提供减轻受试者的疼痛的方法, 该方法包括施用治疗有效量的超纯阿佳酸。该阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力可以大于对于 CB1 受体的亲和力。在一些实施方式中, 阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比其对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍、约 5 倍至 50 倍、约 15 倍至 50 倍、约 10 倍至约 40 倍、或约 20 倍至约 40 倍。疼痛的减轻可以根据至少一个疼痛量表进行测量。例如, 在 11 点疼痛量表上, 疼痛可以减轻至少约 1 个点、至少约 2 个点、至少约 3 个点、至少约 4 个点、至少约 5 个点、至少约 6 个点、至少约 7 个点或至少约 8 个点。

[0017] 本发明还提供减轻受试者的炎症的方法, 该方法包括施用治疗有效量的超纯阿佳

酸。该阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力可以大于对于 CB1 受体的亲和力。在一些实施方式中,阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力比其对于 CB1 受体的亲和力高约 2 倍至约 100 倍、约 5 倍至 50 倍、约 15 倍至 50 倍、约 10 倍至约 40 倍、或约 20 倍至约 40 倍。炎症的减轻可以通过至少一种炎症检测法进行测量。

附图说明

[0018] 图 1 示出阿佳酸 ((6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢大麻酚-9-羧酸)和天然存在的戊基侧链类似物 (6aR, 10aR)- Δ 8-四氢大麻酚-9-羧酸的结构。

[0019] 图 2 示出用于超纯阿佳酸合成的一些关键步骤。

[0020] 图 3 示出用于合成超纯阿佳酸 (AJA) 的方案。

[0021] 图 4 示出如美国专利号 5, 338, 753 所述的 AJA 批料和由 5-(1', 1'-二甲基庚基)-间苯二酚 (DMHR) 制成的超纯 AJA 批料-批号 JBA1001A04 的性质的比较。

[0022] 图 5A 和图 5B 示出由超纯的 5-(1', 1'-二甲基庚基)-间苯二酚 (DMHR) 制备的 AJA 的 LC-MS 分析。

[0023] 图 6 示出合成的超纯 AJA 的 HPLC 分析。

[0024] 图 7 示出合成的超纯 AJA 的 HPLC 分析的放大图像。

[0025] 图 8 示出显示 99.8%纯度的超纯 AJA 的分析。

[0026] 图 9 示出对于所选的大麻素的亲和常数。超纯 AJA 显示在对于 CB1 和 CB2 受体的 K_i 之间具有显著不同。

[0027] 图 10 示出来自 Burstein, S. H. et al. (1992) Synthetic nonpsychotropic cannabinoids with potent antiinflammatory, analgesic, and leukocyte antiadhesion activities, J Med Chem 35(17), 3135-3141 的 AJA 的僵住 (cataleptic) 作用和抗伤害感受 (antinociceptive) 作用。

[0028] 图 11 示出如 Dyson 等人 [3] 所述对大鼠进行全身给药后血浆和脑中的大麻素水平。

[0029] 图 12 示出所选的大麻素对于 CB2 和 CB1 的代表性结合曲线。

[0030] 图 13 示出 CP55940 (圆圈) 和 JBT-101 (超纯 AJA; 方块) 对在 HEK-293 细胞中表达的 hCB1 和 hCB2 受体 (分别为上图和下图) 中的 [35 S]GTP γ S 周转 (turnover) 的效应。各个浓度-效应曲线代表 4 次重复的平均值 ($\pm$ SEM)。根据 Wiley 等人 (20) 调整所使用的条件。

[0031] 图 14 示出 JBT-101 在环试验中仅在 30mg/kg 及以上的高剂量下为活性的。所有药物均在油中经口给予。条件如 Wiley JL 和 Martin BR(21) 所报道的。认为该效应是 CB1 介导的。

[0032] 图 15 示出 JBT-101 在小鼠热板试验中仅在 30mg/kg 及以上的高剂量下为活性的。与之相比, HU-239 (即美国专利号 5, 338, 753 中报道的 AJA) 在经口给予的低剂量下是活性的 (<0.5 mg/kg)。MPE: 最大可能效应。实验条件如 Burstein 等人 (22) 所报道的。

[0033] 图 16 示出 JBT-101 在小鼠降低体温 (hypothermia) 试验中为非活性的。所有的药物均在油中经口给予。实验条件如 Wiley JL 和 Martin BR(21) 所报道的。认为该效应是 CB1 介导的。

[0034] 图 17 示出在 HL-60 细胞中刺激 PGJ 的过程中超纯 JBT-101 的 CB2 特异性。CB2 拮抗剂 SR144528 在低浓度（方块）下减少 HL60 免疫系统细胞中的超纯 AJA 诱导的 PGJ 合成。CB1 拮抗剂 SR141716 具有小得多的效应（三角形）。DMSO 对照（空心圆）。在具有 20,000 细胞 / 500 μ l RPMI/FCS 培养基 / 孔的 48 孔板中对细胞进行处理。将细胞在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 20 小时。将培养基改为 500 μ l 无血清的 RPMI 并添加 TNF α (10nM)。用 SR144528 [1 μ M] 或 SR141716 [10 μ M] 处理 2 小时, 取出 100 μ l 用于 ELISA 测定。N = 4。

[0035] 图 18 示出 JBT-101 在博来霉素 (bleomycin) 小鼠硬皮病模型 (CB2 依赖性反应) 中对于抑制皮肤纤维化是有效的。每天通过局部注射博来霉素并经口施用所示剂量的 JBT-101 (超纯 AJA) 对小鼠进行治疗。所有剂量 (包括 1mg/kg 的剂量 (数据未示出)) 对于抑制皮肤增厚均同等有效。

[0036] 图 19 示出 JBT-101 (超纯 AJA) 在远低于观察到 CB1 活性的剂量的剂量下在花生四烯酸诱导的爪肿胀模型 (CB2 依赖性反应) 中对于抑制爪体积是有效的。小鼠经口施用所示剂量的 JBT-101 (超纯 AJA), 90 分钟后在右爪经足底注射 (intraplanar injection) 花生四烯酸。在花生四烯酸注射后 45 分钟测量右爪体积。

[0037] 发明详述

[0038] THC 衍生物

[0039] 四氢大麻酚 (THC) 是大麻的主要精神活性成分。除了改变情绪的作用之外, 已报道 THC 表现出其它活性, 其中一些可能具有治疗价值, 包括镇痛、抗炎和镇吐性质。THC 的潜在治疗价值已导致寻找相关化合物, 所述化合物使精神活性作用最小化, 同时保留潜在的药用价值活性。

[0040] 例如, (6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢-大麻酚-9-羧酸 (也称为阿佳酸 (AJA)) 可以单独地或与其它物质联合用于治疗疼痛和炎症。

[0041] 当前对于大麻素在疼痛和炎症方面的研究的知识体系表明, CB1 和 CB2 受体在引发和维持与伤害感受、致敏、疼痛信号传递和疼痛处理相关的突触后信号和免疫机制中起重要作用 [C. Voscopoulos and M. Lema, Br. J. Anaesth. (2010) 105(suppl 1):i69-i85.]。以前, 阿佳酸的早期制剂已显示对于 CB1 和 CB2 受体二者均具有亲和力, 并且对于 CB1 受体的亲和力更高。本发明首次提供纯化形式的阿佳酸, 其对于 CB2 受体比对于 CB1 受体具有更高的亲和力。纯化形式的阿佳酸也称为超纯阿佳酸。

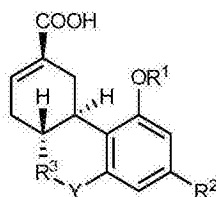
[0042] 在各个实施方式中, 阿佳酸的纯度为大于约 95% (w/w)、大于约 96% (w/w)、大于约 97% (w/w)、大于约 98% (w/w)、大于约 99% v、大于约 99.1% (w/w)、大于约 99.2% (w/w)、大于约 99.3% (w/w)、大于约 99.4% (w/w)、大于约 99.5% (w/w) 或大于约 99.9% (w/w)。可以通过如下进一步描述的各种不同方法评估纯度。

[0043] 纯化形式的阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力可比对于 CB1 受体的亲和力高约 5 倍至约 10 倍, 但是本发明也涵盖约 5 倍-50 倍、7 倍-10 倍、8 倍-15 倍、10 倍-20 倍、15 倍-30 倍、25 倍-50 倍、40-75 倍和 50 倍-100 倍的亲和力范围 (范围表示阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力与对于 CB1 受体的亲和力的比值)。

[0044] 在一个实施方式中, 本发明化合物具有式 I 中所示的结构。本发明化合物可以具有大于约 97%、约 98%、约 99%、约 99.1%、约 99.2%、约 99.3%、约 99.4%、约 99.5% 或约 99.9% 的纯度。本发明化合物可以含有少于 0.1% (w/w) 的 11-羟

基-(6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢大麻酚 (HU-210) 或其它高 CB1 活性的化合物。纯化形式的本发明化合物也可以被称为超纯形式。本发明也涵盖式 I 中化合物的药学上可接受的盐、酯或溶剂化物。

[0045]



式 I

[0046] 其中 R₁ 是氢、COCH₃ 或 COCH₂CH₃; R₂ 为支链的 C₅-C₁₂ 烷基, 其可以任选地具有末端芳环, 或任选的支链的 OCHCH₃(CH₂)_m 烷基, 其可以具有末端芳环, 且其中 m 为 0 至 7; R₃ 为氢、C₁-C₈ 烷基或 C₁-C₈ 烷醇基; 且 Y 为零 (即不存在) 或桥连基团 NH 或氧 (条件是其中 Y 为氧且 R₂ 为支链的 C₅-C₁₂ 烷基, R₃ 不是 CHCH₃)。

[0047] 超纯阿佳酸的制备

[0048] 本发明提供制备纯化形式的阿佳酸的方法。该方法可以包含以下步骤: (a) 使对薄荷基-2, 8-二烯-1-醇 (PMD) 和 5-(1, 1'-二甲基庚基) 间苯二酚 (DMHR) 反应以形成 (6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢大麻酚 (化合物 8); (b) 使化合物 8 乙酰化以形成 (6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢大麻酚乙酸酯 (化合物 9); (c) 使化合物 9 氧化以形成 11-氧代-(6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢大麻酚乙酸酯 (化合物 10); (d) 使用过氧化氢氧化化合物 10 以形成 (6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢大麻酚-9-羧酸乙酸酯 (化合物 11), 其中过氧化氢与化合物 9 的摩尔比为约 2:1 至约 7:1; (e) 使化合物 11 水解以生成粗品阿佳酸; (f) 使粗品阿佳酸乙酰化以形成化合物 11; 和 (g) 使化合物 11 水解以形成纯化形式的阿佳酸。

[0049] 在步骤 (d) 中, 过氧化氢与化合物 9 的摩尔比也可以为约 2:1 至约 6:1、约 2:1 至约 5:1、约 2:1 至约 4:1、约 2:1、约 2.5:1、约 3:1、约 3.5:1 或约 4:1。在步骤 (a) 中, PMD 与 DMHR 的摩尔比可以为约 1:1 至约 3:1、约 1:1 至约 2:1、约 1:1 至约 1.1:1、约 1.1:1、或约 1.2:1。步骤 (a) 可以在约 50°C 至约 120°C、约 60°C 至约 110°C、约 70°C 至约 100°C、约 75°C 至约 90°C、约 70°C 至约 80°C、约 70°C、约 75°C 或约 80°C 下进行。纯化的阿佳酸的纯度可以为大于约 95% (w/w)、大于约 96% (w/w)、大于约 97% (w/w)、大于约 98% (w/w)、大于约 99% v、大于约 99.1% (w/w)、大于约 99.2% (w/w)、大于约 99.3% (w/w)、大于约 99.4% (w/w)、大于约 99.5% (w/w) 或大于约 99.9% (w/w)。

[0050] 在某些实施方式中, 本发明的化合物含有一个或多个手性中心。术语“纯度”也可以涵盖手性纯度。阿佳酸的立体异构体的纯度是指该立体异构体的化学纯度和 / 或手性纯度。例如, 阿佳酸的纯度可包括阿佳酸的化学纯度和手性纯度两者。阿佳酸的立体异构体的手性纯度可以为大于约 98.5% (w/w)、大于约 95% (w/w)、大于约 96% (w/w)、大于约 97% (w/w)、大于约 98% (w/w)、大于约 99% v、大于约 99.1% (w/w)、大于约 99.2% (w/w)、大于约 99.3% (w/w)、大于约 99.4% (w/w)、大于约 99.5% (w/w) 或大于约 99.9% (w/w)。

[0051] 可以通过气相色谱法 (GC) 或高压液相色谱法 (HPLC) 来测定本发明化合物的纯

度。用于测定阿佳酸的纯度和用于确定存在的杂质的其它技术包括但不限于核磁共振 (NMR) 波谱法、质谱法 (MS)、GC-MS、红外光谱法 (IR)、薄层色谱法 (TLC) 和差示扫描量热法。可以通过手性 GC 或测量旋光度来评估手性纯度。

[0052] 纯化形式的阿佳酸在储存后可以是稳定的。例如,在约 5℃ 下储存至少 3 个月之后,本发明组合物可以含有大于约 98.5% (w/w)、大于约 99% (w/w)、大于约 99.5% (w/w) 或大于约 99.9% (w/w) 的阿佳酸。在 25℃ 和 60% 相对湿度下储存至少 3 个月,本发明组合物可含有大于约 98.5% (w/w)、大于约 99% (w/w)、大于约 99.5% (w/w) 或大于约 99.9% (w/w) 的阿佳酸。

[0053] 该方法的几个实施方式在下文描述。其仅用于举例说明的目的而不是限制本发明。

[0054] 纯化

[0055] A. 应用于阿佳酸合成的烯丙基氧化的优化

[0056] 用二氧化硒、随后用过氧化氢使 11- 位含有甲基的化合物 9 发生烯丙基氧化,提供了一种合成阿佳酸至完全的方式,而不产生不完全氧化的中间体例如给出高 CB1 活性的 11- 位为醇的 HU-210。相对于化合物 9,使用 8 当量的过氧化氢的初始实验室实验表明,在 4-6 小时内实现充分转化⁴,参见图 2。

[0057] 因为氧化反应是有潜在危险的,特别是当大规模进行时,所以进行安全评估。过氧化氢的当量数在 2、2.5、3 和 4 当量之间变化⁵。使用这些减少当量的过氧化氢的热起始温度相对于使用 8 当量时观察到的 55℃ 的起始温度没有发生变化;但是使用减少当量的过氧化氢时,最大自热速率仅为 7℃ /min,其比先前观察到的使用 8 当量过氧化氢时测量的 1000℃ /min 显著降低。在使用 2 当量的过氧化氢的情况下,未观察到热事件;但是未实现反应完全,在 45 小时后实现的醛转化为酸的转化率为 74.1% (其没有满足对于醛 ≤ 10.0% 的规定)。对于 2.5、3 和 4 当量的情况,实现了反应完全,然而使用这些当量数的过氧化氢时,仍然可能发生失控 (runaway) 反应。

[0058] 因此假设使用 4 当量的过氧化氢进行计算,以测定在热失控事件下添加冷冻水的速率和淬灭该反应所需的体积。测定以 7℃ /min 的速率控制热失控的适当的冷冻水添加速率和体积,并且使用 3 当量的过氧化氢实施运行 400g 非 GMP 批料的方案,其中在热失控事件下可获得预冷冻水。在生产运行中在该步骤的执行期间没有观察到不可控的热行为。经过这 3 个步骤还观察到提高的产率,产率从 16% 升高至 21%。

[0059] 相对于现有技术存在一些优点。虽然没有改变合成中使用的试剂,但已证明使用 8 当量的过氧化氢¹的现有技术操作得过于密集以至于可能发生灾难性事件。通过进行安全性评价和着眼于减少当量的过氧化氢,已定义了合成超纯阿佳酸中使用的烯丙基氧化反应的安全可缩放的方法,同时还提高了产率 (从 16% 至 21%)。

[0060] B. 由 DMHR 和 PMD 合成阿佳酸的改进

[0061] 可以从 Norac Pharma (Azusa, California) 购得超纯 DMHR (5-(1,1-二甲基庚基)间苯二酚)。

[0062] 改进的合成方法及安全性

[0063] 步骤 1 制备 (6aR,10aR)-3-(1',1'-二甲基庚基)- Δ 8-四氢大麻酚

[0064] 首先,将反应中使用的 PMD (图 3 中的 7a) 的量从 1.25 当量减少至 1.1 当量,因为

0.1 当量过量的 PMD 足以与所有的 DMHR (图 3 中的 6) 反应。

[0065] 以前的方法描述了将批料加热至回流 ($\sim 110^{\circ}\text{C}$) 持续 3 小时。虽然在共沸除去水方面是有效的并满足 $\leq 2.0\%$ (AUC) 大麻二酚的规定,但是该方法在延长加热时诱导化合物 1 的分解和 DMHR 的再生成。为了避免副产物的形成,反应在 75°C (该温度与随后的乙酰化反应的温度相同) 下进行并稳定 24 小时,对反应时间没有影响。为了共沸除去水,将反应物置于部分真空下。使用 Dean-Stark 分离器以收集水,并将终点重新定义为分离器中不再收集水的点。

[0066] 最后,重新检查结晶条件。溶解度研究显示,改善产率最有效的异丙醇 (IPA) 与水的比率为 3:1 至 5:1 的 IPA: 水。这与使用比率为 5.33:1 的先前方法形成对比。在用不同比率进行试验后,使用 8:2 的 IPA: 水作为用于结晶的溶剂比率。此外,通过减慢搅拌速率改善晶体大小,所述搅拌速率使较大晶体保持完整。

[0067] 不再需要用于结晶的晶种,因为乙酰化的 PMD/DMHR 偶联产物按所述的方法始终结晶。

[0068] 步骤 2 制备 (6aR, 10aR)-3-(1', 1'-二甲基庚基)- Δ^8 -四氢大麻酚-9-羧酸乙酯

[0069] 以前的方法使用 3 当量的过氧化氢进行氧化反应。虽然这比在另一以前的方法中使用的 8 当量安全得多,但是仍存在热失控的可能性。因此,对 2 当量的过氧化氢进行评价,因为以前的安全性研究表明 2 当量的过氧化氢显著降低热失控的风险。48 小时后,该反应不满足未反应的醛 $<10\%$ (AUC) 的规定。不管怎样,反应进行直至得到粗品阿佳酸 (6.2% 产率, 96.8% (AUC) 纯度)。虽然纯度是相当的,但是产率显著低于使用 3 当量的过氧化氢的反应。使用 3 当量的过氧化氢,并因此在生产过程中对于该步骤的密切的技术监督能够确保良好的温度控制。此外,如以前对 400g 非-GMP 批料所进行的,在不受控制的放热反应的事件下冷冻水作为淬灭选择而存在。

[0070] 以前在过氧化氢氧化后使用甲苯作为萃取溶剂。然后该方法需要将混合物蒸发至干并添加庚烷。由于蒸发至干不易于放大并且将溶剂从甲苯换为庚烷不是有效可行的,评价其它溶剂作为可能的萃取溶剂。首先,评估庚烷。尽管庚烷将产物成功萃取到有机层中,但是相分离是缓慢的并且存在三层。在第二次尝试中,没有使用萃取溶剂,观察到用 20wt% 硫代硫酸钠淬灭过氧化氢反应导致生成两相。因此,可以在不添加有机溶剂的情况下除去水层。

[0071] 在合成方法开发的过程中,水解之后的相分离因为形成 3 层、中间层的高粘度和所有相为深色而是有问题的。评价 MTBE 代替庚烷作为可能的萃取溶剂。虽然 MTBE 萃取导致快速相分离形成 2 层—深棕色的有机层和透明的红色水层, HPLC 分析显示,产物和所有的杂质均留在有机层中。然后重新评价庚烷作为萃取溶剂。如在 400g 批料生产中观察到的,反应混合物分离成 3 个深色层;然而中间的油层的移动性多得多(据信是由于存在 THF)。HPLC 分析表明,顶部有机层中含有杂质但不含有产物,而两个底层含有大多数产物和微量杂质。虽然相分离由于深颜色而仍然是难以可视化的,但是庚烷萃取能够将产物与杂质分离。

[0072] 在环境温度而不是 $45\text{--}55^{\circ}\text{C}$ 下进行后续的酸化和萃取步骤。这些条件降低了 MTBE 水解生成氯代甲烷和叔丁醇的风险。

[0073] 下一步骤是通过 Celite 过滤该批料以破坏乳液。因为过滤是明显缓慢的,在过滤之前将水层除去。将溶剂从 MTBE 换为乙腈是成功的,并且不再需要晶种进行结晶,因为粗品阿佳酸按照所描述的方法始终结晶。

[0074] 步骤 3 制备粗品阿佳酸

[0075] 为了避免难以将溶剂从甲苯换为庚烷,在 45–55℃ 下在庚烷中完成乙酰化反应。对于小规模,该变化是成功的,但是在将 ~ 0.5 当量的吡啶以 14.5g 的规模加入到反应器之后,反应混合物发生凝固。尝试回收阿佳酸,添加 MTBE 以溶解沉淀物并使用盐酸以除去吡啶。这种尝试是不成功的,因为在用旋转蒸发器蒸发溶剂时固体沉淀出来。NMR 分析显示沉淀物是阿佳酸-吡啶部分盐。完成几个实验以确定盐形成的原因。首先,以较小规模 (~ 2.5g) 进行相同反应。将吡啶 (0.5 当量) 缓慢添加到混合物中。再次,反应发生凝固。然而当添加全部 2.1 当量的吡啶时这得到补救。然后在 25℃ 和 75℃ 下进行反应,再次在添加全部量的吡啶之前添加 0.5 当量的吡啶。在这两种情况下,该盐沉淀,但是一旦添加所有的吡啶,则该盐溶解。由于更大的批料尺寸需要更缓慢的添加,该方法被认为是不可放大的。

[0076] 因此,将溶解在庚烷 (6 当量) 中的粗品阿佳酸添加到含有全部 2.1 当量的溶解在庚烷 (2 当量) 中的吡啶的反应器中。这避免了部分盐的形成,因为吡啶总是过量的。这也使反应体积增加至 10 当量庚烷 (使用 2 个额外当量来洗涤反应器),其在结晶期间改善移动性。

[0077] 步骤 4 制备超纯阿佳酸

[0078] 在该步骤中进行与步骤 2 后处理中相似的变化,因为进行相同的反应。在环境温度下进行反应混合物的酸化以避免 MTBE 水解,并加入额外的水洗涤以避免炉的腐蚀。

[0079] 步骤 4 的主要问题是干燥时间。对于以前的 400g 非 GMP 活动批料,其需要 9 天以达到 $\leq 410\text{ppm}$ 乙腈的规定。因此评价在 IPA/ 水中的结晶化。溶解度研究表明,阿佳酸在 1:1 的 IPA/ 水混合物中的溶解度与阿佳酸在 3:1 的乙腈 / 水混合物中的溶解度相似。虽然从 IPA/ 水中成功地分离了阿佳酸,干燥时间并没有得到改善,需要 >7 天以达到在 2.5g 规模上 $\leq 5000\text{ppm}$ IPA 的规定。产物中剩余的 IPA 的量与 LOD 不相关,表明水在干燥时间方面起到关键作用。因此,在 19.5g 规模上评价在纯乙腈中的结晶化。这产生了短得多的干燥时间,并且在 81 小时不存在可检测量的乙腈。

[0080] 成功地采用超纯 DMHR (纯度为 99.4% (AUC)) 的使用试验 (use-test) 以得到阿佳酸。该阿佳酸的纯度为 99.9% (AUC),无 $\geq 0.04\%$ 的单峰。

[0081] C. 由超纯 DMHR 和 PMD 合成阿佳酸 (大规模)

[0082] 步骤 1

[0083] 向 200 加仑的反应器中加入超纯 DMHR (20.0kg, 1 当量)、PTSA (3.40kg, 0.2 当量) 和甲苯 (102.3kg, 5 体积当量)。向该混合物中经 38 分钟添加 PMD (14.18kg, 1.1 当量),随后进行甲苯漂洗 (17.4kg, 1 体积当量),同时保持批料温度为 15–30℃。将批料在部分真空下加热至 70–80℃,并使用填充有甲苯的 Dean-Stark 分离器通过与甲苯共沸蒸馏除去水,同时保持恒定体积的甲苯。通过 HPLC 确定该反应在 2 小时后反应完全,未检测到大麻二酚并获得 $\Delta 8:\Delta 9$ 比率为 106:1 (规定为 $\leq 2.0\%$ (AUC) 大麻二酚且 $\Delta 8:\Delta 9$ 比率 $\geq 4:1$)。将批料保持在 25℃ 和大气压力下过夜。

[0084] 将该批料重新加热至 70–80℃,分别经 ~ 30 分钟添加吡啶 (10.70kg, 1.6 当量)

和乙酸酐 (13.80kg, 1.6 当量), 同时保持批料温度为 70–80℃。2 小时后, 将批料取样, 并符合化合物 1 $\leq$ 2.0% (AUC) 的规定, 检测到 0.4% (AUC) 的化合物 1。添加水 (160.0kg, 8 当量), 并将该批料调节至 50–60℃。除去下层的水层, 并将批料用水 (40kg, 2.0 当量) 在 50–60℃ 进一步洗涤。将反应混合物从 200 加仑反应器转移到 250 升的反应器中。

[0085] 蒸馏除去甲苯 (100L, 5 体积当量), 并添加 IPA (78.6kg, 8 体积当量)。这再重复两次, 之后对样品进行测试, 并符合甲苯 $\leq$ 2.0% (AUC) 的规定。将该批料保持在 20 至 30℃ 下过夜。IPA (31.4kg, 2 体积当量) 添加之后, 将批料重新加热至 45–55℃, 添加水 (40.0kg, 2 体积当量), 并将该温度保持额外 $\sim$ 1 小时, 随后以 $\sim$ 10℃ / 小时冷却至 25 $\pm$ 2℃。将批料保持在该温度下 16 小时以上, 然后以 10℃ / 小时冷却至 0–5℃ 并保持另外的 2 小时 10 分钟。浆料含有不能流动通过底部出口阀的大颗粒。因此, 通过将反应器加热至 55℃ 而使产物溶解回到溶液中。将批料冷却至 35℃, 在此温度下保持过夜, 并过滤得到第一批次产物。然后使滤液循环返回反应器中, 冷却至 5℃, 并进一步分离产物, 作为第二批次产物。两批次产物用 20% 的水在 IPA 中的溶液洗涤 ($\sim$ 36L 用于洗涤第一产物和 $\sim$ 24L 用于洗涤第二批次产物)。然后在真空下在 122° F (50 $\pm$ 5℃) 下干燥两批次产物。取出产物, 给出化合物 2 的实际总重量为 25.76kg—第一批次产物得到的实际重量为 14.50kg (97.0% (AUC) 纯度), 第二批次产物得到的实际重量为 11.26kg (93.3% (AUC) 纯度)。

[0086] 步骤 2

[0087] 向 200 加仑的反应器中加入化合物 2 (25.76kg, 1 当量)、二氧化硒 (8.66kg, 1.25 当量)、四氢呋喃 (98.5kg, 4.3 体积当量) 和水 (5.2kg, 0.2 当量)。将反应器加热并保持在 55–65℃。20.5 小时后, 通过 HPLC 认为反应完全, 符合化合物 2 $\leq$ 2.0% (AUC) 的规定, 残留的化合物 2 为 1.8% (AUC)。该批料经 $\sim$ 3 小时冷却至 0–10℃。在保持批料温度 $<$ 25℃ 的同时, 添加 35wt% 的过氧化氢 (18.21kg, 3 当量)。然后将批料温度调节至 10–25℃, 并保持在 该温度直到反应经 HPLC 检测满足化合物 10 $\leq$ 10.0% (AUC) 的规定。在 $\sim$ 16 小时, 认为反应完全 (1.7% (AUC) 的残留化合物 10), 并用 20wt% 的硫代硫酸钠溶液 (98.8kg, 2 当量) 缓慢淬灭, 同时保持批料温度 $<$ 35℃。2 小时 13 分钟后, 不存在过氧化物。将批料通过 Celite 垫过滤, 并用 22.9kg THF (1 体积当量) 洗涤 Celite 饼。使相分离并将水层排出。然后将该反应混合物用 10wt% 氯化钠 (51.6kg, 2 当量) 洗涤, 并连同水 (128.8kg, 5 当量) 一起转移回到洁净的 200 加仑反应器中。向该溶液中加入 50wt% 的氢氧化钠溶液 (18.8kg, 3.8 当量), 同时保持批料温度 $<$ 55℃。将该批料保持在 45–55℃ 下 $\sim$ 1 小时, 此后对该批料进行取样, 经 HPLC 检测满足化合物 11 $\leq$ 2.0% (AUC) 的规定, 检测到 0.1% (AUC) 的残留化合物 11。

[0088] 将反应物冷却至 25 $\pm$ 2℃, 并添加庚烷 (44.1kg, 2.5 体积当量)。将反应混合物搅拌 30 分钟并静置 48 分钟。观察到三个相: 底部的红 / 棕色水层, 中间的粘稠黑色层和顶部的清澈红色有机层。除去顶部的有机层, 合并含有产物的中间层和底层, 并用另一 44.1kg (2.5 体积当量) 的庚烷洗涤。再次, 观察到三个相, 并除去顶部有机层。

[0089] 保持温度 $\leq$ 30℃ 的同时, 将合并的中间层和底层的 pH 用 37wt% 盐酸 (24.38kg) 调节至 pH $<$ 1.5。添加 MTBE (66.8kg, 3.5 体积当量), 并将混合物搅拌 30 分钟, 随后静置 20 分钟。当试图排出下层水相时, 观察到各相尚未完全分离。通过采用小等份的反应混合物 (在早期取出进行 pH 测试) 进行试验, 向反应器中添加更多的 MTBE (66.7kg, 3.5 体积当

量)。搅拌 30 分钟后,使反应混合物静置另外的 2 小时,将下层水相排出,产生完全的相分离。将反应混合物用水(51.5kg,2 当量)洗涤并保持过夜 15 小时 10 分钟,随后排出下部的水层。将反应混合物通过 Celite 垫过滤,将滤饼用 MTBE(9.53kg,0.5 体积当量)洗涤。将批料转移到 250 升反应器中,并通过蒸馏除去 160 升(~6.2 体积当量)溶剂。[注:调节蒸馏体积以适应额外添加的 MTBE]。添加乙腈(30.4kg,1.5 体积当量),并除去 38-42 升(~1.5 体积当量)的溶剂。重复该操作三次。将批料以~10℃/h 冷却至 0-5℃,在该温度下保持 2 小时,并过滤。然后将滤饼用 30.4kg 的预冷冻乙腈(1.5 体积当量)洗涤。将滤饼脱液并在 122°F(50±5℃)下干燥之后,将产物取出,得到粗品阿佳酸(实际重量为 5.29kg;产率为 21.1%;通过 HPLC 使用方法 A(参见表 1)纯度为 99.0%(AUC)),为类白色固体。

[0090] 表 1

[0091] 含量测定和相关物质

[0092] 色谱条件

[0093] HPLC 系统在梯度模式下运行。

[0094]

柱子	Agilent Zorbax SB-CN, 5μm, 4.6 × 250 mm, P/N:880975-905		
流速	1.5 mL/min		
进样体积	10 μL		
自动进样温度	环境温度		
柱温	环境温度		
检测波长	220 nm		
运行时间	37 min		
泵 A	水, HPLC 级		
泵 B	乙腈: 甲醇(90:10), 含 0.1%磷酸		
针头清洗	甲醇		
梯度程序	<u>时间(min)</u>	<u>泵 A (%)</u>	<u>泵 B (%)</u>
	0	55	45
	20	45	55
	30	0	100
	30.1	55	45
	37	55	45

[0095] 步骤 3

[0096] 向 40 升反应器中加入粗品阿佳酸(5.28kg,1 当量)和庚烷(21.8kg,6 体积当量)。

向 250 升反应器中加入吡啶 (2.18kg, 2.1 当量) 和庚烷 (7.2kg, 2 体积当量)。然后将这两个反应器均加热至 50–60°C。在 40 升反应器中的内容物溶解后, 将溶液转移到 250 升反应器, 并使用另外的庚烷 (7.2kg, 2 体积当量) 冲洗 40 升反应器, 并将洗涤液转移到 250 升反应器中。在保持批料温度为 50–60°C 的同时, 添加乙酸酐 (2.50kg, 1.8 当量), 并将反应混合物搅拌 2 小时。对反应混合物取样并显示出 0.8% (AUC) 的粗品阿佳酸, 这不满足 $\leq 0.5\%$ (AUC) 的规定。3 小时后获得第二样品, 该样品符合上述规定, 检测到 0.2% (AUC) 的粗品阿佳酸。

[0097] 然后向反应器中缓慢添加去离子 (DI) 水 (7.40kg, 1.4 当量), 同时将温度保持在 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 。将反应混合物搅拌 2 小时, 并通过 HPLC 分析, 以满足通过 HPLC 检测 $\leq 0.5\%$ 的乙酰化的阿佳酸酐 (AUC) 的规定, 检测到 0.3% (AUC) 的乙酰化的阿佳酸。将下部水层排出, 将有机相用 1N 盐酸 (14.80kg, 2.8 当量) 洗涤。水层的 pH 为 3, 满足 $\text{pH} \leq 5$ 的规定。再次用水 (7.40kg, 1.4 当量) 洗涤有机层, 以得到 pH 4, 其满足 $\text{pH} \geq 3$ 的规定。使该批料以 $\sim 10^\circ\text{C}/\text{h}$ 冷却至 $0-5^\circ\text{C}$ 过夜, 然后在 $0-5^\circ\text{C}$ 保持 3 小时。将批料过滤, 用预冷却的庚烷 (11.2kg, 3 当量) 洗涤, 并在 122°F ($50 \pm 5^\circ\text{C}$) 在真空下干燥。将产物取出, 得到乙酰化的阿佳酸 (5.03kg 实际重量, 86.1% 产率), 为白色固体, 通过 HPLC (方法 A) 测定纯度为 99.2% (AUC)。

[0098] 步骤 4

[0099] 向 40 升反应器中加入乙酰化的阿佳酸 (5.02kg, 1 当量)、MTBE (15.37kg, 4.13 体积当量) 和 2N NaOH (14.54kg, 2.400 当量), 同时保持批料温度 $\leq 50^\circ\text{C}$ 。将批料保持在 $45-55^\circ\text{C}$ 下 4 小时 2 分钟, 在此之后, 该批料没有未反应的乙酰化的阿佳酸, 并经 HPLC 测定满足 $\leq 0.5\%$ (AUC) 的乙酰化的阿佳酸的规定。使反应混合物冷却至 25°C 。在保持批料温度为 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 的同时, 将批料用 37wt% HCl (3.62kg, 0.60 体积当量) 酸化。搅拌 30 分钟后, 分离下部水层, 将有机层用水 (5.53kg, 1.1 当量) 洗涤。pH 为 2。进行另外两次水洗涤, 使反应混合物达到 pH 3。尽管这没有满足 $\text{pH} > 3$ 的规定, 但是反应继续进行。

[0100] 将有机层通过 Celite、10 微米过滤器和 2.4 微米过滤器过滤到 250 升反应器中。然后用 MTBE (1.86kg, 0.5 体积当量) 洗涤 40 升反应器, 将批料和洗涤液一起通过 10 微米和 2.4 微米的过滤器转移回到洁净的 40 升反应器中。蒸馏除去 MTBE (10 升, 2 体积当量), 并添加乙腈 (17.4kg, 4.4 体积当量)。然后, 蒸馏除去 22.25 升 (~ 4.4 体积当量) 溶剂, 并通过 NMR 对馏出物进行分析, 显示 46% 的 MTBE。最后, 添加额外的乙腈 (17.4kg, 4.4 体积当量), 并蒸馏除去 14.6 升 (2.9 体积当量) 溶剂。通过 NMR 对馏出物进行分析, 显示 0.6% 的 MTBE。将温度经 9 小时 25 分钟调节至 $20-30^\circ\text{C}$ 。出现晶体, 并将反应混合物经 2 小时冷却至 $0-5^\circ\text{C}$ 。保持 3 小时, 然后将内容物过滤。将母液循环通过反应器几次以促进浆料转移。用 9.8kg (2.5 体积当量) 预冷冻的乙腈洗涤晶体。在真空烘箱中在 $122-130^\circ\text{F}$ 干燥产物, 伴随轻微的氮气排放。258 小时后, 将产物用 GC 进行含量测定, 满足 $\leq 200\text{ppm}$ 的规定。将产物取出, 得到阿佳酸 (4.12kg 实际重量, 90.7% 产率), 通过 HPLC (方法 A) 测得纯度为 99.8% (AUC)。

[0101] 受体结合

[0102] 亲和力或结合亲和力是两个或更多个不同的分子实体之间 (例如在化合物和受体之间) 的相互结合作用的强度的量度, 其可以通过平衡结合常数或动力学结合速率参数

来定义。适合的常数或参数及其测量单位的例子是本领域所熟知的,包括但不限于缔合常数 (K_A);解离常数 (K_D) 或抑制常数 (K_i);缔合速率常数 (K_{on}) 和解离速率常数 (K_{off})。在一个实施方式中, K_i 等于 $[\text{受体}] \cdot [\text{抑制剂}] / [\text{被抑制剂结合的受体}]$,所以 K_i 是抑制剂与受体结合的平衡常数。在 K_A 的情况下,值越高表示结合亲和力越强或越大。在 K_i (或 K_D) 的情况下,值越低表示结合亲和力越强或越大。

[0103] 本发明化合物 (例如超纯 AJA) 对于 CB2 受体比对于 CB1 受体具有更大的亲和力。这意味着本发明化合物 (例如超纯 AJA) 相比于 CB1 与 CB2 结合得更紧密,即与其 K_i (CB1) (即对于 CB1 受体的 K_i) 相比具有更小的 K_i (CB2) (即对于 CB2 受体的 K_i)。同样地,本发明化合物 (例如超纯 AJA) 对于 CB1 受体比对于 CB2 受体具有更少的亲和力。换句话说,本发明化合物 (例如超纯 AJA) 相比于 CB2 与 CB1 结合得不太强,即与其 K_i (CB2) 相比具有更大的 K_i (CB1)。

[0104] 纯化形式的阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力可以比对于 CB1 受体的亲和力高约 5 倍至约 10 倍。本发明也涵盖以下范围:约 5 倍至约 50 倍、约 7 倍至约 10 倍、约 8 倍至约 15 倍、约 10 倍至约 20 倍、约 15 倍至约 30 倍、约 25 倍至约 50 倍、约 40 至约 75 倍、约 50 倍至约 100 倍、约 2 倍至约 1000 倍、约 2 倍至约 800 倍、约 5 倍至约 600 倍、约 10 倍至约 500 倍、约 15 倍至约 300 倍、约 5 倍至约 200 倍、约 10 倍至约 100 倍、约 20 倍至约 80 倍或约 10 倍至约 50 倍 (范围表示阿佳酸对于 CB2 受体的亲和力与对于 CB1 受体的亲和力的比率,即 K_i (CB1) / K_i (CB2))。

[0105] 在一些实施方式中,本发明化合物 (例如超纯 AJA) 的 K_i (CB1) (即对于 CB1 受体的 K_i) 可以是 K_i (CB2) (即对于 CB2 受体的 K_i) 的至少约 2 倍、至少约 3 倍、至少约 4 倍、至少约 5 倍、至少约 8 倍、至少约 10 倍、至少约 50 倍、至少约 100 倍、至少约 200 倍、至少约 400 倍、至少约 500 倍、至少约 1000 倍、至少约 10,000 倍、约 2 倍至约 10,000 倍、约 2 倍至约 1,000 倍、约 5 倍至约 500 倍、约 5 倍至约 100 倍、约 7 倍至约 10 倍、约 8 倍至约 15 倍、约 10 倍至约 20 倍、约 15 倍至约 30 倍、约 25 倍至约 50 倍、约 40 倍至约 75 倍、或约 50 倍至约 100 倍。

[0106] 本发明化合物 (例如超纯 AJA) 的 K_i (CB1) / K_i (CB2) 的比率可以为至少约 2、至少约 3、至少约 4、至少约 5、至少约 8、至少约 10、至少约 50、至少约 100、至少约 200、至少约 400、至少约 500、至少约 1000、至少约 10,000、约 2 至约 10,000、约 2 至约 1,000、约 5 至约 500、约 5 至约 100、约 7 至约 10、约 8 至约 15、约 10 至约 20、约 15 至约 30、约 25 至约 50、约 40 至约 75、或约 50 至约 100。

[0107] 在某些实施方式中,纯化形式的 AJA 对于 CB2 受体的 K_i 为约 150nM 或更小、约 125nM 或更小、约 110nM 或更小、约 100nM 或更小、约 90nM 或更小、约 80nM 或更小、约 70nM 或更小、约 60nM 或更小、约 50nM 或更小、约 40nM 或更小、或约 30nM 或更小。

[0108] 可使用任何常规的测量受体结合亲和力的方法来测定配体与 CB1 或 CB2 受体的结合 (参见, Pertwee RG. Pharmacological action of cannabinoids. Handbook Exp. Pharmacol 168:1-51(2005); McPartland et al. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. British J. Pharmacology 152:583-593(2007))。

[0109] 可以直接或间接地测量两个组分之间的结合亲和力。可以使用指示亲和力和 / 或

与亲和力成比例的替代属性进行间接的亲和力测量。这样的替代属性包括：第一组分与第二组分结合的量或水平；或者第一组分或第二组分的生物物理特性，该生物物理特性预测第一组分对第二组分的表观结合亲和力或是与第一组分对第二组分的表观结合亲和力相关。具体的实例包括：在第一或第二组分的亚饱和浓度下测量第一组分与第二组分结合的量或水平。可以测量的其他生物物理特性可以包括但不限于第一组分和第二组分中的一个或两个的净分子电荷、旋转活性、扩散速率、熔化温度、静电转向或构象。可测量的其他生物物理特性包括测定相互结合作用的稳定性对不同温度、pH 值或离子强度的影响。

[0110] 可通过测量化合物/受体复合物形成和解离的速率来定量结合亲和力。因此，可通过计算浓度以及缔合和解离的实际速率来确定“缔合速率常数 (on rate constant (K_{on}))”和“解离速率常数 (off rate constant (K_{off}))”(参见 Nature 361:186-87 (1993))。 K_{off}/K_{on} 的比率等于解离常数 K_D (一般参见 Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473)。可以通过测定法如放射性配体结合测定法 (例如如实施例 4 中所描述的方法) 或本领域技术人员已知的类似测定法来测量 K_i 。

[0111] 可以通过标记化合物之间的竞争结合测定法和提高未标记化合物的浓度来测定对各个受体的相对亲和力。可通过使用标记化合物的竞争 FACS 或其他竞争性结合测定法来测定结合亲和力。

[0112] 也可通过表面等离子体共振 (SPR) 来测定化合物对受体的结合亲和力。可以通过 BIAcore 技术 (GE) 或 KinExA® (Sapidyne Instruments) 亲和力分析来测定 K_D 或 K_i 。

[0113] 治疗的病况

[0114] 本发明还提供通过向受试者施用本发明化合物或组合物来治疗或预防本文所述的病况的方法。

[0115] 可通过本发明化合物或组合物治疗或预防的病况包括但不限于纤维化疾病、炎症疾病和疼痛。纤维化疾病包括例如硬皮病、系统性硬化症、硬皮病样病症、无皮肤硬化的硬皮病、肝硬化、间质性肺纤维化、特发性肺纤维化、Dupuytren 挛缩、疤痕疙瘩、囊性纤维化、慢性肾脏疾病、慢性移植物排斥、器官 (如肝、食道、心脏、肺、肠等) 的纤维化、和其它结疤/伤口愈合异常、手术后粘连以及反应性纤维化。炎症疾病包括例如全身性红斑狼疮、AIDs、多发性硬化、类风湿性关节炎、银屑病、1 型糖尿病、糖尿病、癌症、哮喘、特应性皮炎、自身免疫甲状腺病症、溃疡性结肠炎、克罗恩病；神经变性疾病如阿尔茨海默氏病、帕金森病、中风和缺血。

[0116] 纤维化的非限制性实例包括肝纤维化、肺纤维化 (例如硅肺病 (silicosis)、石棉肺 (asbestosis) 和特发性肺纤维化)、口腔纤维化、心内膜心肌纤维化、腹膜后纤维化、三角肌纤维化、肾纤维化 (包括糖尿病肾病 (diabetic nephropathy))、囊性纤维化和肾小球硬化 (glomerulosclerosis)。肝纤维化例如作为对于慢性肝损伤的伤口愈合反应的一部分而发生。纤维化可作为以下的并发症发生：血色病 (haemochromatosis)、威尔逊病 (Wilson's disease)、酒精中毒 (alcoholism)、血吸虫病 (schistosomiasis)、病毒性肝炎 (viral hepatitis)、胆管梗阻 (bile duct obstruction)、暴露于毒素和代谢紊乱 (metabolic disorders)。心内膜心肌纤维化是一种特发性病症，其特征在于出现限制型心肌病 (restrictive cardiomyopathy)。在心内膜心肌纤维化中，内在过程产生心脏的心内膜表面的斑块状纤维化 (patchy fibrosis)，导致降低的顺应性并最终导致限制性生理机

能,因为心内膜心肌表面变得更普遍参与其中。口腔粘膜下纤维化是一种慢性、使人虚弱的口腔疾病,其特征就在于粘膜下组织(固有层(lamina propria)和更深层的结缔组织)的炎症和进行性纤维化(progressive fibrosis)。颊粘膜是最常涉及的部位,但是可涉及口腔的任何部分,甚至是咽部。腹膜后纤维化的特征在于出现整个腹膜后的广泛纤维化,通常集中于第四和第五腰椎的前表面。

[0117] 硬皮病是一种结缔组织疾病,其特征就在于皮肤和内部器官的纤维化。硬皮病具有各种临床表现和各种治疗意义。其包括局部性硬皮病、系统性硬化症、硬皮病样病症和无皮肤硬化的硬皮病。系统性硬化症可以是弥漫性的或局限性的。局限性系统性硬化症也被称为CREST(钙质沉着(calcinosis)、Raynaud 食道功能障碍(Raynaud's esophageal dysfunction)、指端硬化(sclerodactyly)、毛细血管扩张(telangiectasia))。系统性硬化症包括硬皮病肺疾病;硬皮病肾危象(scleroderma renal crisis);心脏表现(cardiac manifestations);肌肉无力(muscular weakness)(包括疲劳或局限性CREST);胃肠运动障碍(dysmotility)和痉挛(spasm);以及中枢、外周和自主神经系统的异常。

[0118] 硬皮病(且尤其是系统性硬化症)的主要症状或表现是纤维化导致的不适当的过度的胶原蛋白合成和沉积、内皮功能障碍、血管痉挛、血管萎陷(collapse)和闭塞(obliteration)。

[0119] 例如,具有如式I所示结构的化合物可以是阿佳酸。特别地,申请人发现,施用超纯阿佳酸有效治疗肺和皮肤的组织纤维化,如使用已良好建立的硬皮病动物模型所展示的,而不具有任何CB1介导的行为副作用。

[0120] 治疗有效量的本发明化合物(例如,超纯阿佳酸)可以降低受试者所经受的疼痛水平。在一个实施方式中,可通过使用视觉模拟评分(VAS)或李克特式量表(Likert-type scale)评估患者所经受的疼痛水平。VAS是直线,线的一端代表无疼痛,直线的另一端代表可想象的最厉害的疼痛。患者被要求在直线上标记他们认为在每个时间点他们的疼痛所在的点,从无疼痛至标记的长度可以与整个量表的长度相关。李克特式量表是评定量表,基于对声明同意或不同意的程度通常在1至5的范围中。也可以使用相似类型的但是基于11点量表(从0至10变化)的量表。这样的疼痛量表可应用于使患者在治疗期间所经受的疼痛水平的变化(例如在疼痛治疗开始之前和之后患者或患者群体所经受的疼痛水平的减少)可视化。美国专利号7,413,748。例如,在11点疼痛量表中,疼痛可以减少至少约1点、至少约2点、至少约3点、至少约4点、至少约5点、至少约6点、至少约7点或至少约8点。疼痛水平也可以通过其他合适的方法来评估。

[0121] 可以使用治疗有效量的本发明化合物(例如超纯阿佳酸)来治疗或预防纤维化。可以使用体外或体内模型评估纤维化。在一个实施方式中,可通过测量对TGF- β 、PDGF、CTGF或其他促纤维化因子响应的细胞外基质蛋白产生的量或通过成纤维细胞激活的标志物的存在来测定体外纤维化。常用终点包括胶原蛋白、纤连蛋白和肌动蛋白的测量。在另一个实施方式中,通过具体组织中的细胞外基质产生的程度来测量体内纤维化。纤维化的体内模型包括化学诱导模型,其中使用外部纤维化介质如博来霉素、HOC1、CCl₄或醇来诱导肝、肾、皮肤或肺的纤维化)。也常使用纤维化的基因模型,包括过度表达TGF- β 、PDGF、骨桥蛋白和白细胞介素的动物,加上紧皮(tsk)小鼠模型。也可以通过其他合适的方法来评估纤维化。

[0122] 可以使用治疗有效量的本发明化合物（例如超纯阿佳酸）来治疗或预防炎症。可以使用体外或体内模型对炎症进行评估。在一个实施方式中，可通过测量炎性细胞的趋化性和激活状态来测定体外炎症。在另一个实施方式中，可通过检查特异性炎症介质如白细胞介素、细胞因子和类花生酸介质的产生来测量炎症。在又一个实施方式中，通过局部组织的肿胀和水肿或白细胞移行来测量体内炎症。炎症的动物模型可以使用刺激物（如佛波醇酯、花生四烯酸、血小板活化因子、酵母聚糖、LPS、硫胶质或其它物质）来引发组织如耳朵、爪、皮肤、腹膜等的炎症。也可以通过器官功能如肺或肾的功能以及通过促炎因子的产生来测量炎症。也可以通过其他合适的方法评估炎症。

[0123] 治疗方法

[0124] 可以向培养中的细胞（例如在体外或离体）或者向受试者（例如在体内）施用本文所述的化合物和组合物以治疗、预防和 / 或诊断如上文所讨论的和下文进一步描述的各种病况 / 疾病。

[0125] 术语“治疗”包括向受试者，例如通过任何途径，例如经口，施用化合物。化合物可单独施用或与第二化合物联合施用。治疗可以是序贯的，在施用其他物质之前或之后施用本发明化合物。或者，可以同时施用各物质。受试者（例如患者）可以是具有病症（例如，如本文所述的病症）、病症症状或具有易患病症的倾向的受试者。治疗并不限于治愈或完全愈合，而且可包括导致以下效果中的一种或多种：缓解、减轻、改变、部分纠正、改良、改善或影响该病症、减少该病症的一种或多种症状或易患该病症的倾向。在一个实施方式中，治疗（至少部分地）缓解或减轻纤维化。在一个实施方式中，治疗减少病症的至少一种症状或延迟病症的至少一种症状的发作。效果超出了无治疗时所见到的效果。

[0126] 有效治疗病症的化合物是指该化合物经单次或多次剂量施用于受试者时有效实现治疗。采用治疗有效量的治疗程度涵盖通过标准临床相关标准测量的对疾病的任何改善或治愈。

[0127] 有效预防病症的化合物的量或所述化合物的“预防有效量”是指经单次或多次剂量施用于受试者时有效预防或延迟病症或病症症状的发作或复发的发生的量。

[0128] 可用本发明的化合物和方法治疗的受试者包括人类和非人类的动物。示例性的人类受试者包括例如具有病症（例如本文描述的病症）的人类患者或正常受试者。本发明的术语“非人类的动物”包括所有的脊椎动物，例如非哺乳动物，如鸡、两栖动物和爬行动物；和哺乳动物，如非人类的灵长类、家养动物和 / 或农业用动物，例如羊、狗、猫、牛、猪等。在一个实施方式中，动物是除啮齿动物（例如大鼠或小鼠）以外的动物或非人类的灵长类。

[0129] 受试者的逐步增高剂量 (TITRATION)

[0130] 可例如通过逐步增高受试者的剂量来优化对受试者的治疗，从而使得可用低于最佳剂量的剂量或无作用的剂量的各化合物开始治疗，并增高以确定治疗和 / 或预防受试者的纤维化或炎性疾病的超纯阿佳酸的最佳剂量。

[0131] 用超纯阿佳酸治疗受试者可导致如头晕、口干、头痛、恶心、苍白、嗜睡和呕吐的副作用。

[0132] 可通过例如在治疗期间（例如在数周、数月或数年的疗程中）以低剂量开始并缓慢向上逐步增高剂量以在一定程度上调节副作用。

[0133] 在一个实施方式中，逐步增高受试者的剂量以尽量减少不良事件并实现适当剂型

的超纯阿佳酸的治疗水平。

[0134] 药物组合物

[0135] 在本发明的方法中可使用本发明超纯化合物（例如超纯阿佳酸）的各种剂型来预防和/或治疗各种病况，其比现有技术的阿佳酸具有更好的安全性和耐受性特性。在某些实施方式中，剂型为口服剂型，如片剂或胶囊剂或肠溶包衣片剂或渗透释放胶囊或独特的赋形剂组合。在其他实施方式中，剂型是液体剂、局部用贴剂、凝胶剂、软膏剂、乳膏剂、气雾剂或吸入制剂。

[0136] 可以将本发明组合物配制成在 24 小时周期内递送约 0.5mg 至约 240mg、约 5mg 至约 180mg、或约 10mg 至约 120mg 的本发明超纯化合物（例如，超纯阿佳酸）。

[0137] 在进一步的实施方式中，剂型包括另外的物质或与第二剂型（其包括另外的物质）一起提供。示例性的另外的物质包括镇痛剂，如 NSAID 或阿片剂；抗炎剂或天然物质如含有不饱和脂肪酸的甘油三酯，或分离的纯脂肪酸如二十碳五烯酸 (EPA)、二高 γ -亚麻酸 (DGLA) 和二十二碳六烯酸 (DHA) 以及其他。在另外的实施方式中，剂型包括胶囊，其中所述胶囊含有材料混合物以提供期望的持续释放制剂。

[0138] 剂型可以包括用半渗透性包衣包衣的片剂。在某些实施方式中，片剂包括两层，一层含有超纯阿佳酸，第二层被称为“推进”层。半渗透性包衣用于使流体（例如水）进入片剂并侵蚀一层或多层。在某些实施方式中，这种持续释放剂型还包括在包衣片剂中心钻孔的激光孔。含有阿佳酸或其他 (3R, 4R)- Δ 8-四氢大麻酚-11-羧酸的层包含阿佳酸或其他 (3R, 4R)- Δ 8-四氢大麻酚-11-羧酸、崩解剂、粘度增强剂、粘合剂和渗透剂。推进层包含崩解剂、粘合剂、渗透剂和粘度增强剂。

[0139] 在另一个方面，本发明的特征在于超纯阿佳酸的剂型，其是控释剂型，该控释剂型提供超纯阿佳酸的控制释放。

[0140] 在进一步的实施方式中，剂型包括包含生物相容性基质和超纯阿佳酸的片剂。持续释放剂型还可以包括含有生物聚合物微球的硬壳胶囊，其含有治疗活性剂。生物相容性基质和生物聚合物微球均含有用于药物释放和递送的孔。通过使生物相容性基质或生物聚合物微球与成孔剂混合来形成这些孔。生物相容性基质或生物聚合物微球各自是由生物相容性聚合物或生物相容性聚合物的混合物制成。可通过使生物相容性聚合物和活性剂（本文所述的化合物）溶解于溶剂中并添加成孔剂（例如挥发性盐）来形成基质和微球。溶剂和成孔剂的蒸发提供了含有活性化合物的基质或微球。在另外的实施方式中，持续释放剂型包括片剂，其中该片剂含有超纯阿佳酸和一种或多种聚合物，并且其中可以通过压制超纯阿佳酸和一种或多种聚合物来制备该片剂。在一些实施方式中，一种或多种聚合物可以包括配制有超纯阿佳酸的吸湿性聚合物。当暴露于水分时，片剂溶解和溶胀。这种溶胀可以使持续释放剂型保持在上 GI 道。通过使用不同等级的聚环氧乙烷可以改变聚合物混合物的溶胀速率。

[0141] 在其他实施方式中，持续释放剂型包括胶囊，该胶囊还包括用活性剂和粘合剂的悬浮液包衣的颗粒芯，该悬浮液随后用聚合物包衣。聚合物可以是速率控制聚合物。在一般情况下，通过溶解活性剂的速率来确定速率控制聚合物的递送速率。

[0142] 可将超纯阿佳酸的各种剂型施用于受试者。示例性剂型包括口服剂型（例如片剂或胶囊剂），局部剂型如局部贴剂，凝胶剂和软膏剂，眼用剂型如滴剂或液体制剂，间质性剂

型如液体制剂,以及吸入剂型(如吸入剂、雾化剂、气雾剂和喷雾剂)。

[0143] 在某些实施方式中,将超纯阿佳酸配制成以下剂型,其中单次剂量为约 0.5mg 至约 120mg,每天一次;或约 0.15mg 至约 40mg,每天至多三次。

[0144] 在其他实施方式中,将超纯阿佳酸配制成以下剂型,其中单次剂量为约 0.01mg 至约 1.5mg/kg 受试者体重。在进一步的实施方式中,该剂型以每天至多 3 次且约 0.003 至约 0.5mg/kg 受试者体重施用。

[0145] 如本文所用,术语“治疗有效量”是足以治疗指定病症或疾病的量,或可替代地,足以获得治疗病症或疾病的药理学响应的量。确定最有效的施用方式和剂量的方法可随着用于治疗的一组合物、治疗目的、治疗的靶细胞和治疗的受试者而变化。通常,可以逐步增高治疗剂量以优化安全性和有效性。可以通过治疗医师选择的剂量水平和方式进行单次或多次施用。本领域技术人员可很容易地确定合适的剂量制剂和施用物质的方法。例如,可以以约 0.01mg/kg 至约 200mg/kg、约 0.1mg/kg 至约 100mg/kg 或约 0.5mg/kg 至约 50mg/kg 施用该组合物。当本文所述的化合物与其他物质或治疗共同施用时,有效量可以小于该物质单独使用时的量。

[0146] 在一个实施方式中,将可在本发明的方法中用于预防和/或治疗上文讨论的病况的一种或多种治疗剂与药学上可接受的载体、媒介物或佐剂一起配制。术语“药学上可接受的载体、媒介物或佐剂”是指可以同本发明化合物一起施用于受试者的载体、媒介物或佐剂,并且其不破坏本发明化合物的药理活性并且在足以递送治疗量的化合物的剂量施用时无毒的。

[0147] 化合物可以被配制成盐如药学上可接受的盐形式,其包括但不限于,与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸等)形成的酸加成盐,和与有机酸(如但不限于乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、马来酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、扑酸(pamoic acid)、藻酸、聚谷氨酸、茶磺酸、茶二磺酸和多聚半乳糖醛酸)形成的盐。药学上可接受的盐还包括碱加成盐,其可以在所存在的酸性质子能够与无机碱或有机碱反应时形成。适合的药学上可接受的碱加成盐包括金属盐,如由铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌制成的盐,或者由有机碱制成的盐,该有机碱包括伯胺、仲胺和叔胺;取代的胺,包括环胺,如咖啡因、精氨酸、二乙胺、N-乙基哌啶、组氨酸、葡糖胺、异丙胺、赖氨酸、吗啉、N-乙基吗啉、哌嗪、哌啶、三乙胺、三甲胺。所有这些盐均可以经由常规方法由本发明的相应化合物通过例如使适当的酸或碱与本发明的化合物反应而制备。Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002) [1]。

[0148] 可以用于本发明的剂型中的药学上可接受的载体、佐剂和媒介物包括但不限于,离子交换剂;氧化铝;硬脂酸铝;卵磷脂;自乳化药物递送系统(SEDDS),如 d-E-生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯;在药物剂型中使用的表面活性剂,如吐温类或其他类似的聚合物递送基质;血清蛋白,如人血清白蛋白;缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐;或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。也可以有利地使用环糊精(如 α -、 β -和 γ -环糊精)或化学修饰的衍生物(如羟基烷基环糊精,包括 2-和 3-羟基丙基- β -环糊精)或其他增溶的衍生物以增强具有本文所述

的式的化合物的递送,所述化合物可在本发明的方法中用于预防和/或治疗纤维化病况。可以在如下文献中找到其它合适的赋形剂:Handbook of Pharmaceutical Excipients, R. C. Rowe, et. al., Pharmaceutical Press, 2009. [9]。在某些实施方式中,单位剂量制剂被配制用于立即释放,但是也公开了配制用于一种或这两种物质的延迟或延长释放的单位剂量制剂。

[0149] 在一个实施方式中,可在本发明的方法中使用的治疗剂被配制为单一单位剂量,使得治疗剂在不同的时间从剂量中释放。

[0150] 在另一实施方式中,例如,其中一种或多种治疗剂以每天一次或两次施用,将该物质配制成提供缓释。例如,将物质配制成具有肠溶包衣。在一个可替代的实施方式中,使用双相控释递送系统配制物质,从而提供延长的胃停留。例如,在一些实施方式中,递送系统包括:(1)由基本上均匀的颗粒形成的内部固体颗粒相,其含有具有高的水溶解度的药物、以及一种或多种亲水性聚合物、一种或多种疏水性聚合物和/或一种或多种疏水物质(如一种或多种蜡、脂肪醇和/或脂肪酸酯),和(2)外部的固体连续相,上述内部固体颗粒相的颗粒嵌入并分散遍及外部的固体连续相中,该外部的固体连续相包括一种或多种疏水性聚合物、一种或多种疏水性聚合物和/或一种或多种疏水物质(如一种或多种蜡、脂肪醇和/或脂肪酸酯),其可被压制成片或填充到胶囊中。在一些实施方式中,将物质掺入由亲水性聚合物组成的聚合物基质中,该基质在吸入水时溶胀至足够大以促进该剂型在进食模式(fed mode)期间保留在胃中的尺寸。

[0151] 制剂中的超纯阿佳酸可以被配制成快速作用形式和控释形式的组合。例如,超纯阿佳酸被配制为具有单一释放性质。例如,其不以修改的释放形式(例如控释形式)存在。

[0152] 本发明组合物可以刚好在三餐中的每一餐、两次主餐中的每一餐、或一餐之前或与其一起服用。在其他实施方式中,本文公开的组合物可以以每天一次或每天两次施用,并且不需要刚好在餐前施用或在用餐时一起服用。

[0153] 可在本发明的方法中使用的本发明的剂型可以经口、经胃肠外、通过吸入喷雾、经局部、经直肠、经间质、经鼻、经颊、经阴道或经由植入式储存器的方式施用,优选经口施用或通过注射施用。本发明的药物组合物可以含有任何常规的无毒的药学上可接受的载体、佐剂或媒介物。在一些情况下,可用药学上可接受的酸、碱或缓冲剂调节制剂的 pH 以增强经过配制的化合物或其递送形式的稳定性。本文所用的术语胃肠外包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0154] 可在本发明的方法中使用的剂型可以是无菌可注射制剂的形式,例如为无菌可注射的水性或油性悬浮液。这种悬浮液可以根据本领域中已知的技术使用适合的分散剂或润湿剂(如,例如吐温 80)和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如为在 1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂为甘露醇、水、林格式溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。此外,通常采用无菌的不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为了这个目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。脂肪酸(如油酸及其甘油酯衍生物)可用于制备可注射制剂,因为它是天然的药学上可接受的油,如橄榄油或蓖麻油,尤其是以它们的聚氧乙基化形式。这些油溶液或悬浮液也可以含有长链醇稀释剂或分散剂,或羧甲基纤维素或类似的在配制药学上可接受的剂型(如乳液剂和混悬剂)中常用的分散剂。出

于配制的目的,也可以使用其他常用的表面活性剂(如吐温或司盘)、和/或其它类似的在生产药学上可接受的固体、液体或其他剂型中常用的乳化剂或生物利用度增强剂。

[0155] 本发明化合物或组合物可以经口施用,例如作为剂型中的一种组分。剂型可以含有任何常规的无毒的药学上可接受的载体、佐剂或媒介物。在一些情况下,可以用药学上可接受的酸、碱或缓冲剂调节制剂的 pH 以增强经过配制的化合物或其递送形式的稳定性。

[0156] 本发明的剂型可以以任何口服可接受的剂型经口施用,所述口服可接受的剂型包括但不限于:胶囊剂、片剂、乳剂和水性悬浮液、分散体和溶液。在用于口服使用的片剂的情况下,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服施用,可用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当以水性悬浮液和/或乳剂进行经口施用时,活性成分可以悬浮或溶解于与乳化剂和/或悬浮剂组合的油相中。期望时,可以添加某些甜味剂和/或调味剂和/或着色剂。

[0157] 本发明的剂型还可以以用于直肠施用的栓剂形式进行施用。这些组合物可通过将可在本发明的方法中用于预防和/或治疗纤维化病况的本发明的化合物与适合的无刺激性赋形剂混合来制备,所述赋形剂在室温下是固体而在直肠温度下为液体,因此其将在直肠中融化以释放活性组分。这样的物质包括但不限于可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0158] 当期望的治疗涉及通过眼部应用容易达到的区域或器官时,眼部施用本发明的剂型是有用的。对于眼部给药,可通过在结膜囊中滴注乳膏、软膏或液滴制剂来施用组合物。

[0159] 当期望的治疗涉及局部应用容易达到的区域或器官时,局部施用本发明的剂型是有用的。对于局部施用于皮肤,剂型应当被配制成为适合的软膏剂,该软膏剂含有悬浮或溶解在载体中的活性组分。用于局部施用本发明的化合物的载体包括但不限于:矿物油、液体石油、白石油、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替代地,可在本发明的方法中使用的药物组合物可被配制为合适的洗剂或乳膏剂,该洗剂或乳膏剂含有悬浮或溶解在载体中的活性化合物和合适的乳化剂。合适的载体包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、鲸蜡酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。本发明的药物组合物还可以通过直肠栓剂制剂或以合适的灌肠制剂局部施用至下肠道。局部透皮贴剂也包括在本发明中。

[0160] 可在本发明的方法中使用的本发明的剂型可以通过鼻气雾剂或通过吸入给药。这种组合物根据药物制剂领域中公知的技术制备并且可以采用苯甲醇或其他合适的防腐剂、用于提高生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或该领域中已知的其他增溶剂或分散剂制备为盐水溶液。

[0161] 当本发明的剂型包含具有本文所述的式的化合物和一种或多种另外的治疗剂或预防剂的组合时,所述化合物和另外的治疗剂或预防剂均应该以介于单一治疗方案中正常施用的剂量的约 1 至 100% 之间、更优选介于约 5 至 95% 之间的剂量水平存在。另外的治疗剂或预防剂可以作为多次给药方案的一部分与本发明的化合物分开给药。可替代地,这些治疗剂或预防剂可以是在单一组合物中与本发明的化合物混合在一起的单一剂型的一部分。

[0162] 在某些实施方式中,可在本发明的方法中使用的剂型包括胶囊,其中所述胶囊包含材料混合物以提供期望的持续释放。

[0163] 在其他实施方式中,可在本发明的方法中使用的剂型包括用半渗透性包衣包衣的

片剂。在某些实施方式中,片剂包括两层,一层含有超纯阿佳酸,第二层被称为“推进”层。半渗透性包衣用于使流体(例如水)进入片剂并侵蚀一层或多层。在某些实施方式中,持续释放剂型还包括在包衣片剂中心钻孔的激光孔。含有超纯阿佳酸的层包含超纯阿佳酸、崩解剂、粘度增强剂、粘合剂和渗透剂。推进层包含崩解剂、粘合剂、渗透剂和粘度增强剂。

[0164] 在进一步的实施方式中,可在本发明的方法中使用的剂型包括片剂,该片剂包含生物相容性基质和超纯阿佳酸。持续释放剂型还可以包括含有生物聚合物微球的硬壳胶囊,其含有治疗活性剂。生物相容性基质和生物聚合物微球各自含有用于药物释放和递送的孔。通过使生物相容性基质或生物聚合物微球与成孔剂混合而形成这些孔。生物相容性基质或生物聚合物微球各自是由生物相容性聚合物或生物相容性聚合物的混合物制成。可通过使生物相容性聚合物和活性剂(本文所述的化合物)溶解于溶剂中并添加成孔剂(例如挥发性盐)而形成基质和微球。溶剂和成孔剂的蒸发提供了含有活性化合物的基质或微球。

[0165] 可在本发明的方法中使用的持续释放剂型包括片剂,其中该片剂含有超纯阿佳酸和一种或多种聚合物,并且其中该片剂可通过压制超纯阿佳酸和一种或多种聚合物来制备。在一些实施方式中,一种或多种聚合物可以包括与超纯阿佳酸活性剂(即本文所述的化合物)一起配制的吸湿性聚合物。当暴露于水分时,片剂溶解和溶胀。这种溶胀使得持续释放剂型保留在上 GI 道中。可通过使用不同等级的聚环氧乙烷来改变聚合物混合物的溶胀速率。

[0166] 在其他实施方式中,可在本发明的方法中使用的持续释放剂型包括胶囊剂,该胶囊剂还包括用活性剂和粘合剂的悬浮液包衣的颗粒芯,该悬浮液随后用聚合物包衣。聚合物可以是速率控制聚合物。在一般情况下,通过溶解活性剂的速率来确定速率控制聚合物的递送速率。

[0167] 胶囊的非限制性实例包括但不限于明胶胶囊、HPMC、硬壳、软壳或用于容纳持续释放混合物的任何其他合适的胶囊。

[0168] 在上述持续释放剂型中使用的溶剂包括但不限于乙酸乙酯、三醋精、二甲亚砜(DMSO)、碳酸亚丙酯、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、乙醇、苯甲醇、四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol)、 α -生育酚、Miglyol 810、异丙醇、邻苯二甲酸二乙酯、聚乙二醇 400(PEG 400)、柠檬酸三乙酯和苯甲酸苄酯。

[0169] 在上述持续释放剂型中使用的粘度调节剂包括但不限于:辛酸/癸酸甘油三酯(Miglyol 810)、肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、油酸乙酯、柠檬酸三乙酯、邻苯二甲酸二甲酯、苯甲酸苄酯和各种等级的聚环氧乙烷。在上述持续释放剂型中使用的高粘度液体载体包括但不限于:蔗糖乙酸酯异丁酸酯(SAIB)和乙酸丁酸纤维素(CAB)381-20。

[0170] 构成优选的半渗透性层的材料的非限制性实例包括但不限于纤维素聚合物,如纤维素乙酸酯、纤维素酰化物、纤维素二酰化物、纤维素三酰化物、纤维素二乙酸酯、纤维素三乙酸酯或其任意混合物;乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、聚乙烯、乙烯共聚物;聚烯烃,包括环氧乙烷共聚物(例如,Engage®—Dupont Dow Elastomer)、聚酰胺、纤维素材料、聚氨酯、聚醚嵌段酰胺和共聚物(例如PEBAX®、纤维素乙酸丁酸酯和聚乙酸乙烯酯)。可以在上述持续释放剂型中使用的崩解剂的非限制性实例包括但不限于交联羧甲基纤维素钠、交聚

维酮、藻酸钠或类似的赋形剂。

[0171] 可以在上述持续释放剂型中使用的粘合剂的非限制实例包括但不限于羟基烷基纤维素、羟基烷基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮。

[0172] 可以在上述持续释放剂型中使用的渗透剂的非限制性实例包括但不限于山梨糖醇、甘露糖醇、氯化钠或其它盐。在上述持续释放剂型中采用的生物相容性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚(羟基酸)、聚酸酐、聚原酸酯、聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基(polyelkylenes)、聚亚烷基二醇(polyelkylene glycols)、聚环氧烷、聚亚烷基对苯二甲酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯卤化物、聚乙烯吡咯烷酮、聚硅氧烷、聚(乙烯醇)、聚(乙酸乙烯酯)、聚苯乙烯、聚氨酯和其共聚物、合成纤维素、聚丙烯酸、聚(丁酸)、聚(戊酸)和聚(丙交酯-共-己内酯)、乙烯乙酸乙烯酯、其共聚物及共混物。

[0173] 可以在上述持续释放剂型中使用的吸湿性聚合物的非限制性实例包括但不限于：聚环氧乙烷(例如，分子量为4,000,000至10,000,000的polyox®)、纤维素羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、交联的聚丙烯酸和黄原胶。

[0174] 可以在上述持续释放剂型中使用的速率控制聚合物的非限制性实例包括但不限于聚合的丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯漆或它们的混合物，聚合的丙烯酸酯漆，甲基丙烯酸酯漆，包含丙烯酸和甲基丙烯酸酯的共聚物的丙烯酸树脂或具有增塑剂的甲基丙烯酸铵漆。

[0175] 试剂盒

[0176] 本文中所描述的剂型可以在试剂盒中提供。试剂盒包括(a)本文所述方法中使用的化合物，和任选的(b)信息材料。信息材料可以是涉及本文所描述的方法和/或该剂型在本文描述的方法中的使用的描述性材料、说明性材料、市场营销材料或其它材料。

[0177] 试剂盒的信息材料在其形式上不受限制。在一个实施方式中，信息材料可包括关于化合物的生产、化合物的分子量、浓度、有效日期、批次或生产场所的信息等的信息。在一个实施方式中，信息材料涉及施用该化合物的方法。

[0178] 在一个实施方式中，信息材料可包括以适合的方式使用本文描述的化合物以进行本文描述的方法(例如进行反应以生产本文所述的化合物)的说明书。

[0179] 试剂盒的信息材料在其形式上不受限制。在许多情况下，信息材料(例如，说明书)以印刷品(例如印刷文本)、图片和/或照片(例如标签或印张)的形式提供。然而，信息材料也可以以其它格式提供，如盲文、计算机可读材料、视频记录或音频记录。在另一个实施方式中，试剂盒的信息材料是联系人信息，例如实际地址、电子邮件地址、网站或电话号码，其中试剂盒的使用者能够获得有关本文描述的化合物和/或其在本文所述的方法中的使用的实质性信息。当然，信息材料也可以任何格式组合提供。

[0180] 除了本文描述的剂型外，试剂盒的组成可包括其它成分，如溶剂或缓冲剂、稳定剂、防腐剂、调味剂(例如，苦味拮抗剂或甜味剂)、芳香剂、染料或着色剂(例如，使试剂盒中的一种或多种组分着色或涂色)、或其它化妆品成分，和/或用于治疗本文所述的病况或病症的第二药剂。可替代地，其他成分可以包括在试剂盒中，但是是在与本文所述的化合物不同的组合物或容器中。在这样的实施方式中，试剂盒可包括用于使本文所述的化合物和其它成分混合的说明书或与其它成分一起使用本文所述的化合物的说明书。

[0181] 在一些实施方式中，试剂盒的组分储存在惰性条件下(例如在氮气或其它惰性气体(如氩气)下)。在一些实施方式中，试剂盒的组分储存在无水条件下(例如，用干燥

剂)。在一些实施方式中,组分储存在一个挡光容器如琥珀色瓶中。

[0182] 本文中所描述的剂型可以任何形式提供,例如液体形式,干燥或冻干的形式。优选本文中所描述的化合物是基本上纯的和/或无菌的。当本文所述的化合物以液体溶液形式提供时,该液体溶液优选为水溶液,并优选无菌的水溶液。当本文描述的化合物以干燥形式提供时,一般通过加入合适的溶剂进行重构(reconstitution)。该溶剂(例如无菌水或缓冲剂)可以任选地在试剂盒中提供。

[0183] 试剂盒可包括用于组合物的一個或多个容器,该组合物包含本文中所描述的剂型。在一些实施方式中,试剂盒包含单独的用于组合物和信息材料的容器、分隔物或隔室。例如,组合物可被容纳在瓶、小瓶或注射器中,而信息材料可被容纳在塑料套筒或包中。在其他实施方式中,试剂盒的单独元件都容纳在单一的、未分开的容器中。例如,剂型被容纳在其上附有标签形式的信息材料的瓶、小瓶或注射器上。在一些实施方式中,试剂盒包括多个(例如,一包)个体容器,每个含有本文所述的化合物的一个或多个单位剂型(例如,本文所述的剂型)。例如,试剂盒包括多个注射器、安瓿、箔包或泡罩包装,每个均含有单个单位剂量的本文中所描述的剂型。

[0184] 试剂盒的容器可以是气密性的、防水的(例如,对于水分或蒸发的变化是不渗透性的)和/或不透光的。

[0185] 试剂盒任选地包括适合使用该剂型的装置,例如注射器、移液管、镊子、量勺、拭子(例如,棉签或木拭子)或者任何这样的装置。

[0186] 因此,已经公开了具体的组合物和超纯的四氢大麻酚-11-羧酸。已经描述了本发明的多个实施方式。然而,可以理解的是,可以进行各种修改而不脱离本发明的精神和范围。因此,其它实施方式在以下所附的权利要求的范围之内。然而,对于本领域技术人员而言显而易见的是,除了已经描述的那些实施方式,可能存在更多的变化实施方式而不脱离本发明的发明构思。因此,本发明的主题除了在本公开的精神内不受其他限制。本文所提及的所有专利、专利公开物和出版物均通过引用将其全部内容并入本文中,以公开和描述与所引用的出版物有关的方法和/或材料。本文所讨论的出版物仅提供其在本申请的申请日以前公开的内容。本文中没有任何内容被理解为承认本发明由于现有发明而不享有早于这些出版物的权利。

实施例

[0187] 提供下述实施例以展示和进一步说明本发明的某些优选实施方式和方面,并且不应解释为限制本发明的范围。

[0188] 实施例 1

[0189] 就 CB1 和 CB2 评价超纯 AJA

[0190] 合成超纯阿佳酸(JBT-101)并将其与 CB1 和 CB2 受体的结合与以前的制剂进行比较。

[0191] 对于超纯 AJA,在其对于 CB1 和 CB2 的 K_i 之间存在显著差异。在一个具体的实施方式中(如图 9 所示),超纯 AJA 对于 CB2 的结合亲和力比对于 CB1 的结合亲和力高约 10 倍至 20 倍。出于比较的目的,图 9 示出各种其他大麻素和其它以前合成制得的 AJA 的各种其它 K_i 和 $K_i(\text{CB1})/K_i(\text{CB2})$ 比率 [10, 11]。

[0192] 实施例 2

[0193] 在相同研究中直接比较 AJA 和 THC

[0194] 1. 结合 -CB1/CB2* CB2 结合是高度期望的性质, 因为其似乎介导抗炎和抗纤维化作用而没有对于精神方面的作用。

[0195] 2. 环试验 - 僵住反应普遍被认为是在脑水平下由 CB1 激动剂活性介导的精神作用。在各种治疗剂量下测试每种化合物 [11]。

[0196] 3. 体内癌症。AJA 对肿瘤生长显示出小的但是显著的抑制, 该抑制大于 THC 所产生的抑制。选择的剂量在抗炎范围内 [12]。

[0197] 4. PK 数据。虽然其在较高剂量下显示一些大麻素样 CNS 活性, 其与其他大麻素化合物相比表现出更好的治疗指数, 这可以反映相对减少的 CNS 渗透 [3]。此外, 药代动力学分析表明, 虽然在大鼠中存在一些脑渗透, 其被限制在一定程度, 在峰值药效时间点测量的脑中峰值水平仅达到血浆中峰值水平的 25% -30%。这与对 WIN55, 212-2 以及 THC 观察到的特性相反, WIN55, 212-2 以及 THC 显示显著更高的相对脑渗透, 脑水平达到血浆中水平的 100-190%。这些数据补充了最近在人体中发现的结果, 其中发现 AJA 降低了神经性疼痛患者的疼痛评分, 且不存在大麻样精神不良事件 [13]。

[0198] 实施例 3

[0199] 超纯 AJA 对于 CB1 和 CB2 受体的活性的研究

[0200] 评价了超纯阿佳酸 (JBT-101) 在小鼠中的药理作用以及对 CB1 和 CB2 大麻素受体的功能性体外激活。

[0201] 具体来说, 评估 JBT-101 在体外刺激 CB1 和 CB2 受体中的 [35S]GTP γ S 周转的能力。还在热板试验中对该化合物评估其抗伤害感受作用以及在环不动性试验中对其评估僵住作用, 这两个试验均在雌性 CD-1 小鼠中进行。还测量这些小鼠的直肠温度。

[0202] 所用方法的介绍

[0203] 用于抗感受伤害的热板试验

[0204] 使用热板试验, 基于将小鼠置于加热至并保持在 54°C -56°C 的铝热板上之后小鼠舔其前爪和 / 或跳起来的反应时间, 来测量超纯 AJA 和其它药物制剂的镇痛活性。Kitchen I and Green PG, Differential Effects of DFP Poisoning and Its Treatment on Opioid Antinociception in the Mouse, Life Sci. 33:669-672(1983)。已显示该试验测量 CB1 激动剂活性。

[0205] 通过使水循环通过金属通路使铝表面保持在 55°C $\pm$ 1°C。将直径为 18cm 且高度为 26cm 的透明塑料圆筒放置在该表面上以防止逃跑。终点取小鼠舔后爪或跳下表面的时间; 在任何情况下动物在板上都未保持 30 秒以上的时间。小鼠仅使用一次; 测量对照值和测试值, 例如间隔 3 个小时。在热板试验前大约 90 分钟经口施用超纯 AJA 和其他试验化合物。通过比较对照值的平均值和测试值的平均值计算反应时间 (潜伏期) 的百分比变化, 并通过配对 t 检验确定统计学显著性。

[0206] 在 0.05 至 56mg/kg 的剂量下对超纯 AJA 进行剂量反应。超纯 AJA 比美国专利号 5, 338, 753 的 AJA 需要高得多的剂量以看到镇痛。

[0207] 僵住作用的测量

[0208] 使用 Pertwee (Pertwee RG, The Ring Test. A Quantitative

Method of Assessing the Cataleptic Effect of Cannabis in Mice, Br. J. Pharmacol. 46:753-763(1972)) 描述的环实验测量僵住反应。将小鼠置于连接于 16cm 垂直杆的直径为 5.5cm 的水平丝环上。将后爪和前爪置于环的相对侧。环境温度保持在 30℃, 且环境中没有听觉刺激和明亮的光线。反应按照小鼠在五 (5) 分钟试验周期内保持不动的时间段进行计算。

[0209] 在 0.05 至 56mg/kg 的口服剂量下对超纯 AJA 进行剂量反应。超纯 AJA 比美国专利号 5,338,753 的 AJA (3a) 需要高得多的剂量以看到僵住。

[0210] GTP- γ -S 测定法

[0211] 当通过激动剂激活 CB1 或 CB2 受体时, G 蛋白 α 亚基对于 GTP 的亲合力相比于对于 GDP 的亲合力增高。结果, GDP 从 G 蛋白中被替换, 而 GTP 或 GTP γ S 结合。如果将放射性标记如 [35 S] 连接到 GTP γ S 分子, 则可使用液体闪烁分光光度法直接测量 G 蛋白/[35 S] GTP γ S 复合物的形成。Weiland et al., (1994), Methods Enzymol 237:3-13。Griffin et al., PET 285:553-560, 1998。

[0212] 使用 GTP- γ -S 测定法来研究 AJA 对人 CB1 和 CB2 受体的功能性活性, 从而进一步测定超纯 AJA 对于 CB2 受体的选择性。如图 13 所示, 在 GTP- γ -S 测定法中超纯 AJA 在 CB2 测定中的效能比在 CB1 测定中的效能高~10 倍, 这进一步支持超纯 AJA 对于 CB2 相比于 CB1 具有改善的选择性。

[0213] 实验细节

[0214] 制备用于体外功能性测定的储备液

[0215] 对于体外功能性测定, 在乙醇或 DMSO 中制备 JBT-101 储备液。

[0216] 制备用于体内测试的溶液

[0217] 将 Δ^9 -THC (National Institute on Drug Abuse (NIDA), Rockville, MD)、吲哚美辛 (indomethacin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 和 JBT-101 溶解于花生油或红花油 (食品级) 媒介物 (vehicle) 中。经由口服强饲施用量为 20 μ l/kg 的化合物。

[0218] 在大麻素受体上的体外功能性测定

[0219] 材料和方法

[0220] CB1 和 CB2 受体分析涉及与 HEK-293 表达系统分离的膜制剂 (购自 Perkin Elmer (Waltham, MA))。由在总体积为 0.4mL 的分析缓冲液 (50mM TRIS-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.5% (w/v) BSA) 中的测试化合物 (250nM-1mM)、GDP (20 μ M)、GTP- γ -[35 S] (100pM) 以及 hCB1 和 hCB2 膜制剂 (0.4pM) 组成的孵育混合物中进行测试化合物的 G-蛋白偶联信号转导 (GTP- γ -[35 S]) 测定。在 100 μ M 未标记的 GTP- γ -S 的存在下测定非特异性结合, 并在不存在药物的情况下测定基础结合。将两份样品在 30℃ 下培养 1 小时, 并如以前所述从反应混合物过滤结合的复合物并在液体闪烁计数器中计数。通过从总结合中减去非特异性结合并除以 (总基础结合减去非特异性结合) 来计算特异性结合。数据用 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 进行绘制和分析。

[0221] 体外测定: 结果与讨论

[0222] CP55940 (阳性对照) 在 nM 浓度下通过 hCB1 受体和 hCB2 受体二者刺激 GTP- γ -35S 周转 (表 2; 对于 CB1, EC₅₀ = 9.99 $\pm$ 2.5nM; 对于 CB2, EC₅₀ = 3.96 $\pm$ 1.3nM)。这些结果表明, CP55,940 在这些 G 蛋白偶联受体位点充当激动剂 (图 13, 上图)。JBT-101

也通过这两个大麻素受体刺激 GTP- γ -35S, 但具有少得多的效能 (图 13, 下图)。JBT-101 在 CB1 受体的 EC50 是 9209 ± 2042 nM, 而在 CB2 受体的 EC50 是 1020 ± 92 nM (表 2)。在激活 CB2 受体与 CB1 受体的效能之间存在 9 倍的差异, 与该化合物对于结合 CB2 受体的 12 倍选择性一致, 表明 JBT-101 可以在对 CB1 受体没有活性的剂量下激活 CB2 受体。

[0223] 表 2. 在 hCB1 受体和 hCB2 受体中的 GTP- γ -35S 周转

[0224]

化合物	hCB ₁ EC ₅₀ (nM)				
	受体 1	受体 2	受体 3	受体 4	平均值 ($\pm$ SEM)
CP55,940	6.989	6.294	9.529	17.14	9.99 (2.5)
JBT-101	13694	5830	11647	5664	9209 (2042)
化合物	hCB ₂ EC ₅₀ (nM)				
	受体 1	受体 2	受体 3	受体 4	平均值 ($\pm$ SEM)
CP55,940	2.81	0.69	5.91	6.41	3.96 (1.3)
JBT-101	930	815	1232	1101	1020 (92)

[0225] 小鼠体内试验

[0226] 受试者

[0227] 在热板伤害感受、直肠温度以及环不动性试验中使用得自 Charles River (Raleigh, NC) 的雌性 CD-1 小鼠 (20-25g) 进行评估。在这组方法中使用单独的小鼠测试每种化合物的每个剂量。当小鼠在自己的笼中时自由获取食物和水。将所有动物保持在 12- 小时明暗循环 (上午 7 时开灯) 的控温环境 (20-22°C) 中。

[0228] 体内方法

[0229] 在一组三个试验中测试每只小鼠, 其中大麻素 CB1 激动剂在小鼠体内产生作用 (Martin 等人, 1991): 抗伤害感受作用 (热板试验)、降低的直肠温度和环不动性。在施用测试化合物之前, 在热板试验中测量小鼠的直肠温度和基线潜伏期。后一方法涉及将小鼠置于设定在 55°C 的热表面 (小鼠冷 / 热板痛觉装置; Stoelting, Wood Dale, IL) 上。测量直到小鼠抬爪或舔爪的时间, 届时将小鼠从装置上取下。如果小鼠在 30 秒内未抬爪或舔爪, 将其从装置上取下并记录潜伏期为 30 秒。在测量基线温度和热板潜伏期后, 经由口服强饲给小鼠施用媒介物或药物。在 (经由口服强饲) 施用花生油媒介物或 JBT-101 后 90 分钟或者在 (经由口服强饲) 施用 Δ 9-THC 或呋喃美辛后 60 分钟再次测量热板潜伏期和温度。随后, 将小鼠置于在 16cm 高度处连接至环架的直径为 5.5cm 的环上, 记录在 5 分钟期间内动物保持不动的时间量。此外, 记录小鼠从环上跌落或跳下来的次数。如果该小鼠从环上跌落的次数多于 5 次, 终止试验。

[0230] 数据分析

[0231] 直肠温度值表示为对照温度（注射前）和药物施用之后的温度之间的差值（ $\Delta^{\circ}\text{C}$ ）。抗伤害感受作用表示为使用 30-s 最大测试潜伏期的百分比最大可能效应（MPE），如下所示： $[(\text{测试值} - \text{对照值}) / (30 - \text{对照值})] \times 100$ 。在评估僵住作用期间，测量小鼠在环装置上保持不动（除了呼吸和胡须活动）的时间总量（按秒计）并将其用作僵住样行为的指征。通过将该值除以 300 秒并乘以 100 从而获得不动性百分比。如果小鼠从环上跌落超过 5 次，则终止试验，并且在分析中不包括该小鼠的环不动性数据。使用单独的受试者之间的 ANOVA 来分析各个测量。需要时，采用 Tukey 事后比较检验（ $\alpha = 0.05$ ）进一步分析与对照（媒介物）的显著性差异。

[0232] 体内试验：结果与讨论

[0233] 对照试验表明，花生油媒介物（阴性对照）在三种试验（热板、直肠温度和僵住）的任何一种中都没有活性 [图 14、图 15 和图 16，各图的左侧]。30mg/kg 剂量的呋喃美辛也未显著影响这三种测量中的任意一种。与之相比，在 30 和 / 或 100mg/kg 的口服剂量下， $\Delta 9$ -THC（阳性对照）就每种测量相比于媒介物情况产生了显著的抗伤害感受作用 [仅 100mg/kg； $F(9, 50) = 5.71, p < 0.05$ 。图 15]、环不动性 [两个剂量都； $F(9, 48) = 21.18, p < 0.05$ 。图 14]、以及降低体温 [两个剂量都； $F(9, 50) = 15.08, p < 0.05$ 。图 16]。在这三种体内试验中在 0.05 至 56mg/kg 的口服剂量下评估 JBT-101。所测试的剂量均未在热板试验中产生显著的抗伤害感受作用（图 15，右侧）或产生显著的直肠温度变化（图 16，右侧）。在 30 和 56mg/kg 的口服剂量下，相比于媒介物情况，JBT-101 显著提高了僵住试验中环不动性百分比 [图 14，右侧。 $F(9, 48) = 21.18, p < 0.05$]。在 30 和 56mg/kg 剂量下的增加幅度是相似的，并且接近于对 30mg/kg 剂量的 $\Delta 9$ -THC 所观察到的增加。较低剂量的 JBT-101（直至 10mg/kg）不影响这一测量。

[0234] 总之，JBT-101 (0.05–56mg/kg) 在小鼠热板和直肠温度试验中产生的作用模式与 $\Delta 9$ -THC（本研究；Martin 等人, 1991）和其它精神活性大麻素（包括氨基烷基呋喃（Compton 等人, 1992a）、二环大麻素（Compton 等人, 1992b）以及呋喃衍生的和吡咯衍生的大麻素（Wiley 等人, 1998；Wiley 等人, 2012））的作用模式并不类似。虽然 JBT-101 在较高的剂量（30 和 56mg/kg）下增加环不动性并且幅度类似于 30mg/kg 的 $\Delta 9$ -THC 所产生的幅度，其整体药理作用模式并未表明为 $\Delta 9$ -THC 样精神活性。

[0235] 总结

[0236] JBT-101（超纯阿佳酸）产生的药理作用特性显著不同于以前报道的阿佳酸的作用。以前合成（未纯化的）的阿佳酸在疼痛和炎症的几个临床前模型中显示出有效性（在 Wiley, 2005 中综述）；然而，其还产生体内药理作用特性，该体内药理作用特性为 $\Delta 9$ -THC 和其他精神活性 CB1 受体激动剂所具有的特性。这些作用包括在小鼠中的抑制自发性活动、抗伤害感受作用、降低体温和僵住作用以及在大鼠中的 $\Delta 9$ -THC 样区别性刺激作用（Vann 等人, 2007）。这些作用与这些早期合成的阿佳酸产品所表现出的良好的 CB1 受体结合亲和力一致：对于 Novartis 化合物， $K_i = 5.7\text{nM}$ （Dyson 等人, 2005）；对于 HU-239， $K_i = 32.3\text{nM}$ （Pertwee 等人, 2010）。此外，这些化合物的 CB1/CB2 结合的比率较低（分别为 0.10 和 0.19）。与之相比，JBT-101 在 CB2 受体（ $K_i = 51 \pm 11\text{nM}$ ）与 CB1 受体（ $K_i = 628 \pm 6\text{nM}$ ）相比表现出多于 12 倍的选择性结合亲和力。如本文所示，JBT-101 对于 CB2 受体的激活相

比于 CB1 受体也表现出类似的选择性。此外,在最高至 56mg/kg (p. o.) 的剂量下,使用超纯阿佳酸观察到最低程度的在施用 Δ^9 -THC 和其他精神活性大麻素之后观察到的特征性行为效应。虽然 JBT-101 增加了环不动性,但是其仅在较高剂量 (30 和 56mg/kg) 下产生该效应。同时,这些结果表明,JBT-101 的作用不同于那些早期合成的 (未纯化的) 阿佳酸的作用。总之,JBT-101 的药理学特性与其为 CB2 选择性化合物且具有极低的 CB1 受体活性相一致。

[0237] 实施例 4

[0238] 所选的大麻素对于 CB2 和 CB1 的结合曲线

[0239] 图 12 示出超纯 AJA 和参考大麻素拮抗剂对于 CB2 和 CB1 的选择性结合曲线。

[0240] CB 受体结合测定

[0241] 膜制备—根据 ATCC (Manassas, Va.) 指南培养 HEK-293T 细胞,并根据制造商的说明书,使用 Polyfect (Qiagen, Valencia, Calif.) 或 Fugene (Roche, Nutley, N. J.), 用有效连接于 SV40 启动子的人 CB1cDNA (Genbank X54937) 或 CB2cDNA (Genbank X74328) 进行转染。在转染 48 小时后,使用细胞刮棒在冰冷的膜缓冲液 (20mM HEPES, 6mM MgCl₂, 1mM EDTA, pH 7.2) 中收获细胞。将细胞转移至氮空化室并施加 900 巴的压力 30 分钟。释放压力,收集细胞碎片,并在 4℃ 下以 1000g 离心 10 分钟。收集上清液并重复自旋直至上清液中没有沉淀物。然后通过 4℃ 下以 12,000g 离心 20 分钟使膜形成小球。将膜再悬浮于适当量的膜缓冲液中。根据制造商的说明书使用 BioRad (Hercules, Calif.) 蛋白质检测染料试剂来测定膜浓度。将膜稀释至 1mg/ml,并将小等份样品速冻在液氮中并储存在 -80℃。

[0242] 结合测定—在 0.5 至 2nM 放射性配体 ([³H]-CP55940; Perkin Elmer, 除了在注明的情况下使用 3nM [³H]-SR141716 作为放射性配体) 和各种浓度的配体 (96 孔板中每孔中总体积为 200 μ L) 的存在下在结合缓冲液 (50mM Tris, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 0.1% BSA, pH 7.4) 中孵育 0.5-10ng 表达人 CB1 或人 CB2 受体的膜。将膜在室温下孵育 2 小时,然后使用 Filtermate 196 Harvester (Packard Instruments, Downers Grove, Ill.), 过滤到预浸的 (用 0.1% 聚乙烯亚胺预浸 1 至 2 小时) 96 孔 GF/B 过滤板 (Packard Bioscience, Shelton, Conn.), 并用 500mL 冰冷的洗涤缓冲液 (25mM HEPES, 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 0.25M NaCl) 洗涤。在向各个孔 (Microscint 20, Packard, Shelton, Conn.) 添加 50 μ L 闪烁液之前干燥过滤板。在 Topcount NXT (Packard, Shelton, Conn.) 上计数板。

[0243] 数据分析—使用 Prism 软件 (GraphPad version 4.0, San Diego, Calif., USA) 通过非线性回归分析绘制图形并确定 IC₅₀ 值。使用 Cheng & Prusoff 方法,使用报道的 SR141716 受体对于人 CB1 受体的 K_i 值为 2.9nM 以及 CP55,940 对于人 CB1 和人 CB2 受体的 K_i 值分别为 2.5nM 和 0.92nM (McPartland et al, BJP, 2007), 由 IC₅₀ 值计算 K_i 值。

[0244] 实施例 5: 超纯 AJA 诱导的 CB₂ 受体介导的体内作用

[0245] 纤维化动物模型—博来霉素诱导的皮肤纤维化

[0246] 每组 8 只小鼠 (6-12 周龄 C57B1) 每天接受皮下注射 (s. c. injections) 博来霉素 (20ug/小鼠) 或媒介物,持续 14 天,随后恢复一周。并行地,在开始第 1 天,将悬浮于 2% 甲基纤维素 (MC) 中的超纯 AJA 或媒介物以 0、2.5、5.0 和 10mg/kg 经口服强饲施用。在第 21 天,处死小鼠。收集并处理它们的皮肤以用于常规组织学 (H&E, 三色和天狼猩红染色)、免疫组织学 (石蜡包埋的或冷冻的样品)、原位杂交、胶原 (SIRCOL) 测定、以及用于实时 qPCR

或微阵列杂交的 RNA 分离。仔细地对皮肤切片进行皮肤炎症、皮肤增厚、胶原累积（三色）和损伤皮肤中的胶原蛋白交联（天狼星红）的表征和量化。

[0247] 结果：如图 18 所示，在小鼠博来霉素模型中，超纯 AJA 在所测试的抑制 CB2 介导的皮肤纤维化的所有剂量下均是有效的。这些相同的剂量对于图 14-16 中所示的 CB1 介导的行为模型是完全无效的，支持了超纯阿佳酸在无任何 CB1 活性的情况下保持 CB2 活性。

[0248] 炎症动物模型 - 爪水肿模型

[0249] 将 CD-1 小鼠（雌性）随机分配到实验组并使其适应环境一周。在施用测试化合物之前，使用水置换装置（容积测量仪 (plethysmometer), Stoelting）在气体（异氟烷）麻醉下测量基线右后爪体积。在第 0 天，经口服强饲施用 0、5、10、50 和 500ug/kg 的悬浮于 2% MC 中的超纯 AJA 或媒介物。在治疗施用后 90 分钟，给予动物 10 微升的 100mg/ml 的花生四烯酸在 5% 乙醇中的溶液，通过皮下注射到右后爪的足底。给动物对照组（第 1 组）施用相同体积的 5% 乙醇溶液。对左后爪未进行注射。在气体麻醉下进行足底内注射。在足底内注射后 45 分钟，使用容积测量仪在气体麻醉下测量右后爪体积。

[0250] 结果：如图 19 所示，在小鼠爪水肿模型中，超纯 AJA 在所测试的抑制炎症的所有剂量下均是有效的。这些相同的剂量对于图 14-16 中所示的 CB1 介导的行为模型是完全无效的，支持超纯阿佳酸在无任何 CB1 活性的情况下保持 CB2 活性。

[0251] 参考文献：

[0252] 1. Stahl, P. H. and Wermuth, C. G., (Eds.) (2002) Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties Selection and Use, Verlag Helvetica Chimica Acta/Wiley-VCH, Zurich.

[0253] 2. Burstein, S. H. ;Audette, C. A. ;Breuer, A. ;Devane, W. A. ;Colodner, S. ; Doyle, S. A. ;Mechoulam, R. J Med Chem 1992, 35, 3135. 3.

[0254] 3. Dyson, A. et al. (2005) Antihyperalgesic properties of the cannabinoid CT-3 in chronic neuropathic and inflammatory pain states in the rat, Pain 116(1-2), 129-137.

[0255] 4. Recht, L. D. et al. (2001) Antitumor effects of ajulemic acid (CT3), a synthetic non-psychoactive cannabinoid, Biochem. Pharmacol. 62(6), 755-763.

[0256] 5. LeRoy, E. C. (1974) Increased Collagen Synthesis by Scleroderma Skin Fibroblasts in Vitro a Possible Defect in the Regulation or Activation of the Scleroderma Fibroblast, J. Clin. Invest. 54(4), 880-889.

[0257] 6. Welch, S. C. and Walters, M. E. (1978) Reduction of aryl diethyl phosphates with titanium metal: a method for deoxygenation of phenols, The Journal of Organic Chemistry 43(25), 4797-4799.

[0258] 7. Wang, F., Chiba, K., and Tada, M. (1992) Facile deoxygenation of phenols and enols using sodium borohydride-nickel chloride, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1(15), 1897-1900.

[0259] 8. Saa, J. M. et al. (1990) Deoxygenation of highly hindered phenols, The Journal of Organic Chemistry 55(3), 991-995.

[0260] 9. Rowe, R. C. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.,

Pharmaceutical Press.

[0261] 10. Pertwee, R. G. et al. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands :Beyond CB1 and CB2, Pharmacol. Rev. 62(4), 588-631.

[0262] 11. Burstein, S. H. et al. (1992) Synthetic nonpsychotropic cannabinoids with potent antiinflammatory, analgesic, and leukocyte antiadhesion activities, J Med Chem 35(17), 3135-3141.

[0263] 12. Recht, L. D. et al. (2001) Antitumor effects of ajulemic acid(CT3), a synthetic non-psychoactive cannabinoid, Biochem Pharmacol 62(6), 755-763.

[0264] 13. Karst, M. et al. (2003) Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain :a randomized controlled trial, Jama 290(13), 1757-1762.

[0265] 14. Rhee M-H, Vogel Z, Barg J, Bayewitch M, Levy R, Hanus L, Breuer A, and Mechoulam R. Cannabinol Derivatives; Binding to Cannabinoid Receptors and Inhibition of Adenylylcyclase. J. Med. Chem. 1997, 40, 3228-3233.

[0266] 15. McPartland JM, Glass M, Pertwee RG. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution :interspecies differences. Br J Pharmacol. 2007 Nov ;152(5) :583-93

[0267] 16. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant(K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition(IC_{50}) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol. 1973 Dec 1; 22(23) :3099-108.

[0268] 17. U. S. Patent No. 5, 338, 753. S. Burstein and R. Mechoulam. (3R, 4R)-A6-THC-7-oic acids useful as antiinflammatory agents and analgesics. (August, 1994).

[0269] 18. Weiland et al., (1994) Measurement of receptor-stimulated guanosine-5'-0-(γ -thio)triphosphate binding by G proteins. Methods Enzymol 237 :3-13.

[0270] 19. Griffin et al., Evaluation of Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists Using the Guanosine-5'-0-(3-[35S]thio)-triphosphate Binding Assay in Rat Cerebellar Membranes, JPET 285 :553-560, 1998.

[0271] 20. Wiley et al., Structural and pharmacological analysis of 0-2050, a putative neutral cannabinoid CB(1)receptor antagonist, Eur. J. Pharmacol. 2011, 651(1-3) :96-105.

[0272] 21. Wiley JL and Martin BR, Cannabinoid pharmacological properties common to other centrally acting drugs, Eur. J. Pharmacol. 2003, 471(3) :185-193

[0273] 22. Burstein, et al. Synthetic non-psychoactive cannabinoids with potent anti-inflammatory, analgesic and leukocyte anti adhesion activities. J. Med. Chem., 35 :3135-3141(1992).

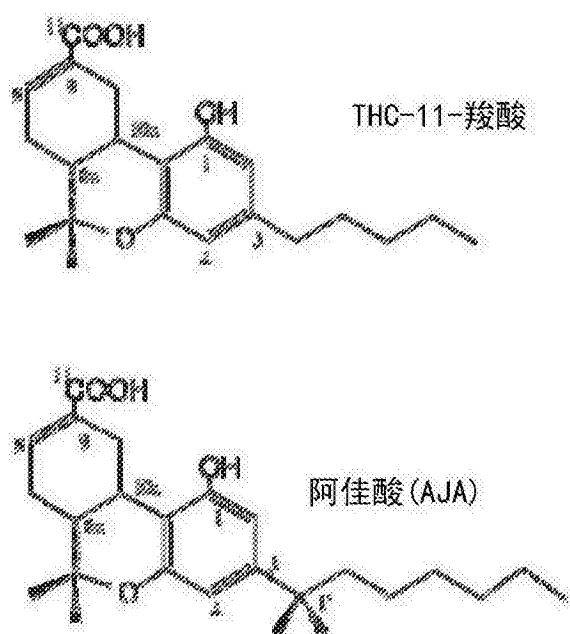


图 1

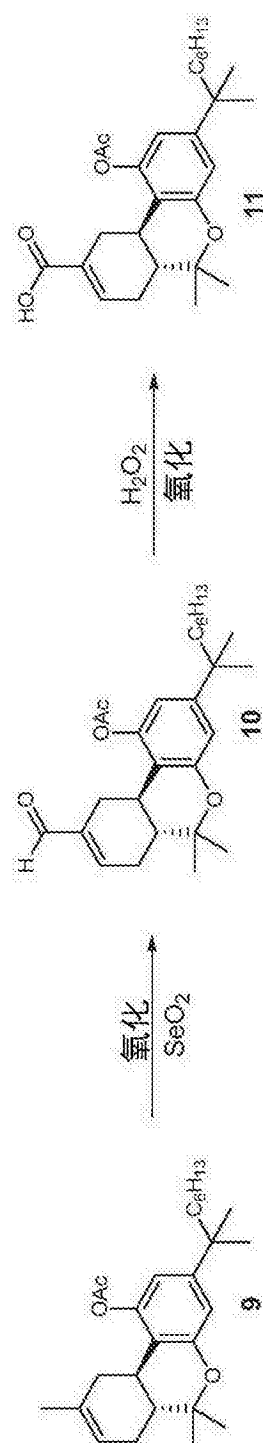


图 2

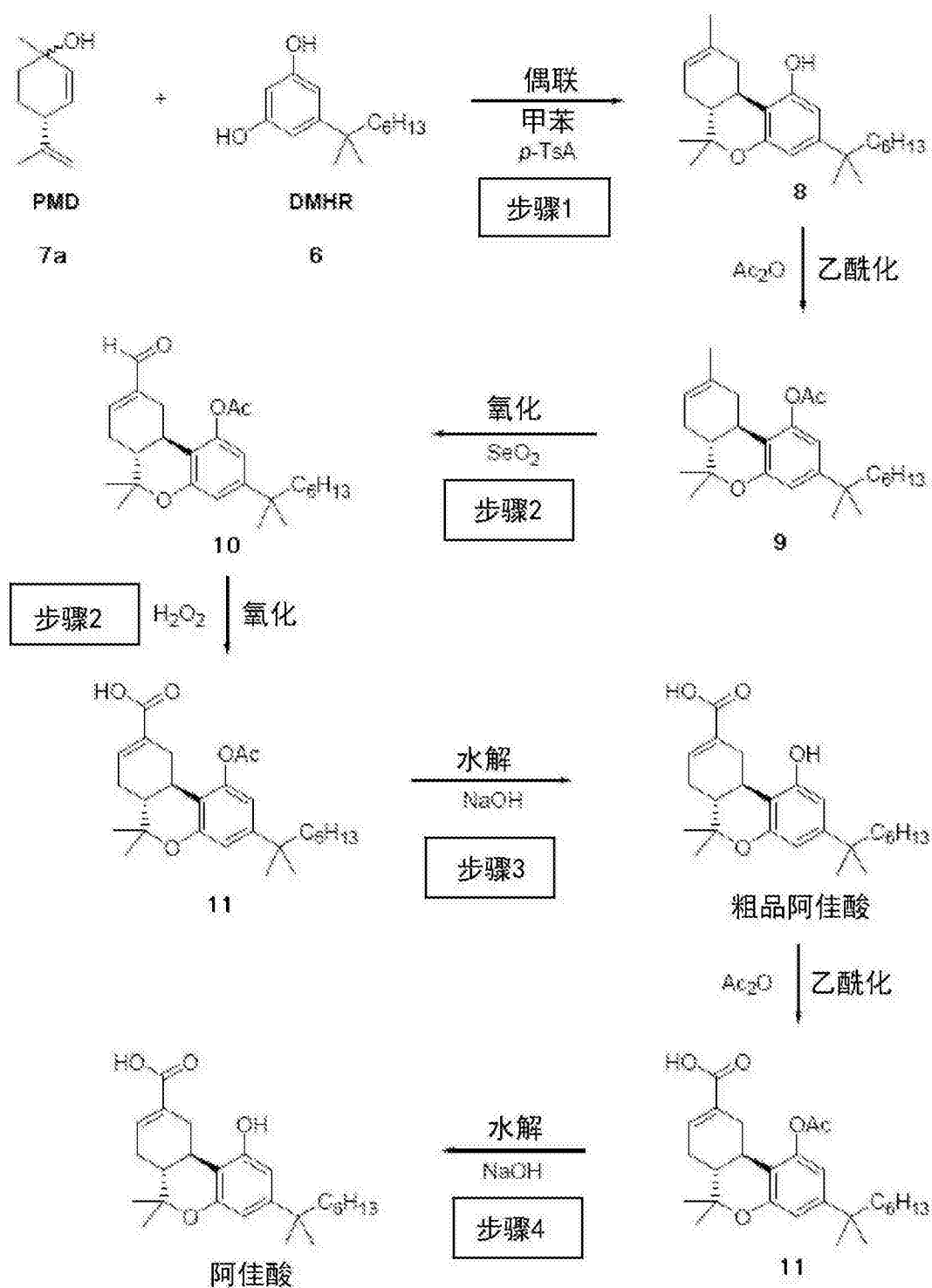


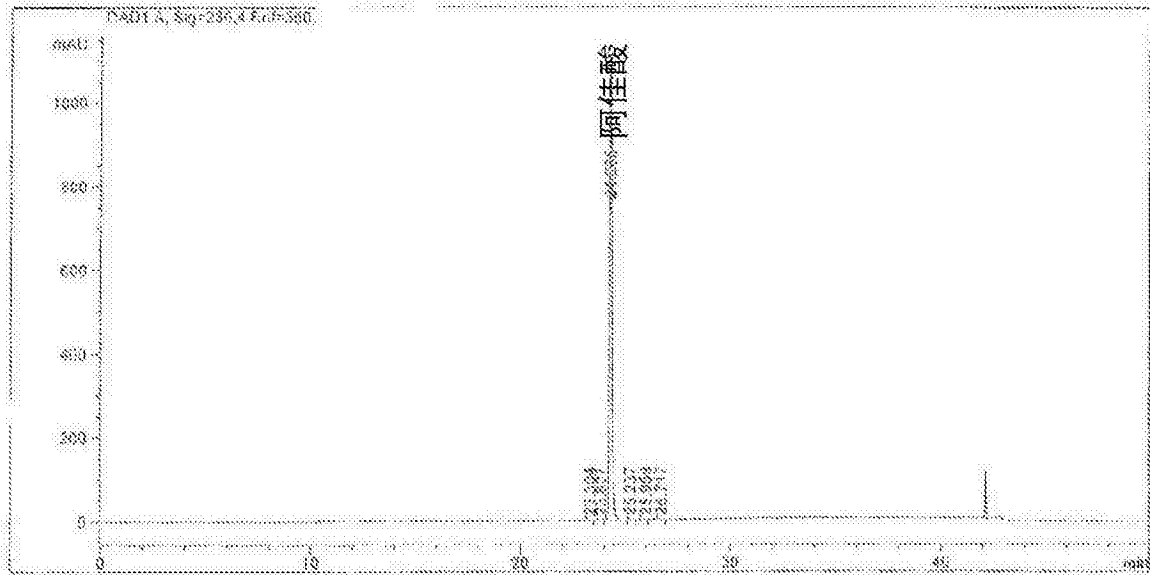
图 3

	AJA (来自专利 5, 338, 753)	AJA (AMRI) 3306-C-R0-01-49-01	AJA (NORAC ULTRAPURE) JBA1001A04
合成方法	醇氧化为羧酸	甲基氧化为羧酸	甲基氧化为羧酸
物质外观	未知	棕褐色固体	白色至棕褐色固体
APCI- MS	与结构一致	与结构一致	与结构一致
质子NMR	与结构一致	与结构一致	与结构一致
碳NMR	未知	与结构一致	与结构一致
IR光谱	宽波段 3100-3600NM	宽波段 2900-3000NM	宽波段 2900-3000NM
熔点	112-114°C	97-99°C	97-99°C
结合亲和力	CB1> CB2 (5:1)	CB2>CB1 (13:1)	CB2>CB1 (12:1)
纯度% (HPLC)	未知	99.0%	99.8%
总杂质	未知	0.3%	0.2%
残留溶剂	未知	<5000PPM	<300PPM
水	未知	1.6%	1.0%

图 4

含量			
重金属	未知	15PPM	21PPM

图 4 续



峰 #	保留时间 [min]	类型	宽度 [min]	面积 [mAU*s]	面积 %	名称
1	23.304	BE	0.1123	2.07701	0.0350	?
2	23.827	MM	0.1594	1.77662	0.0214	?
3	24.265	MM	0.1248	8282.43457	99.8773	阿佳酸
4	25.237	MM	0.1108	3.06267	0.0369	?
5	25.999	MM	0.1785	1.58341	0.0191	?
6	26.717	MM	0.1301	1.57148	0.0202	?

图 5A

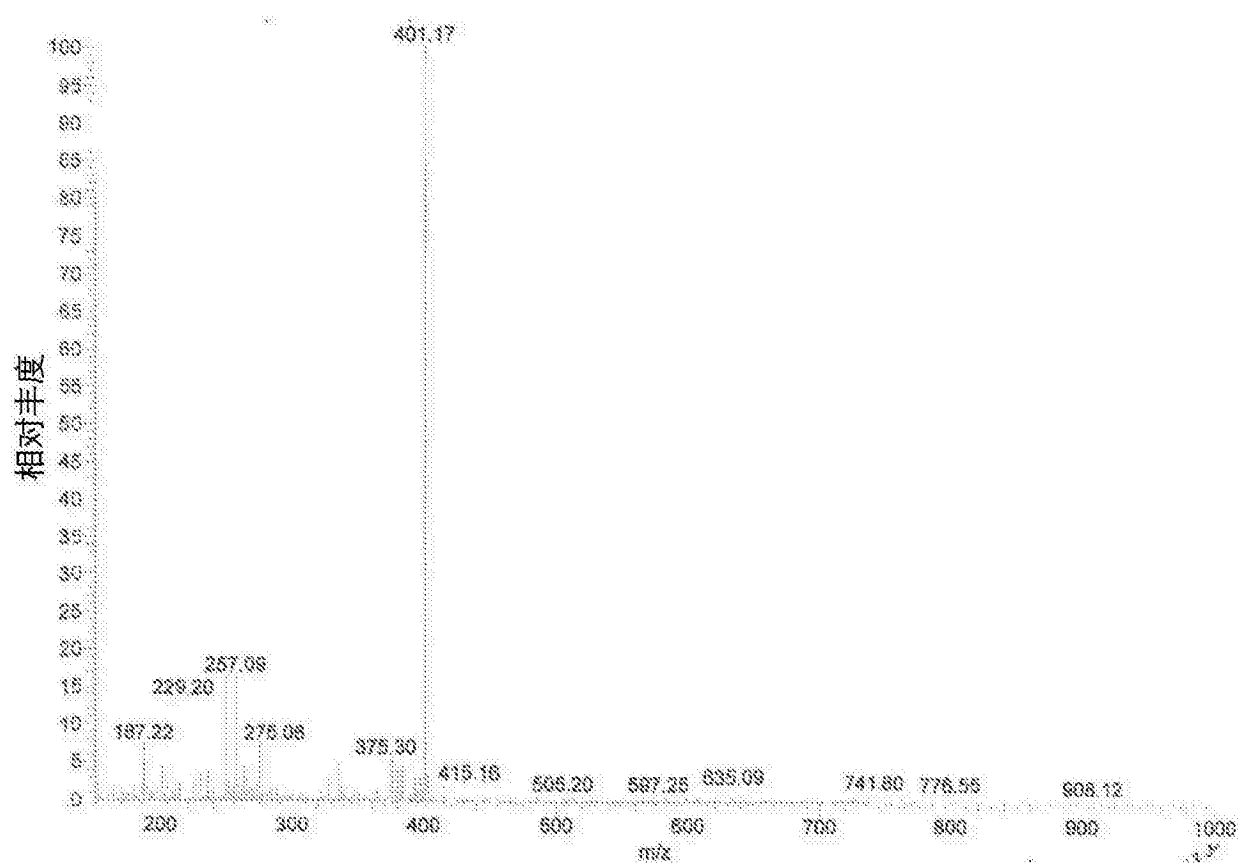


图 5B

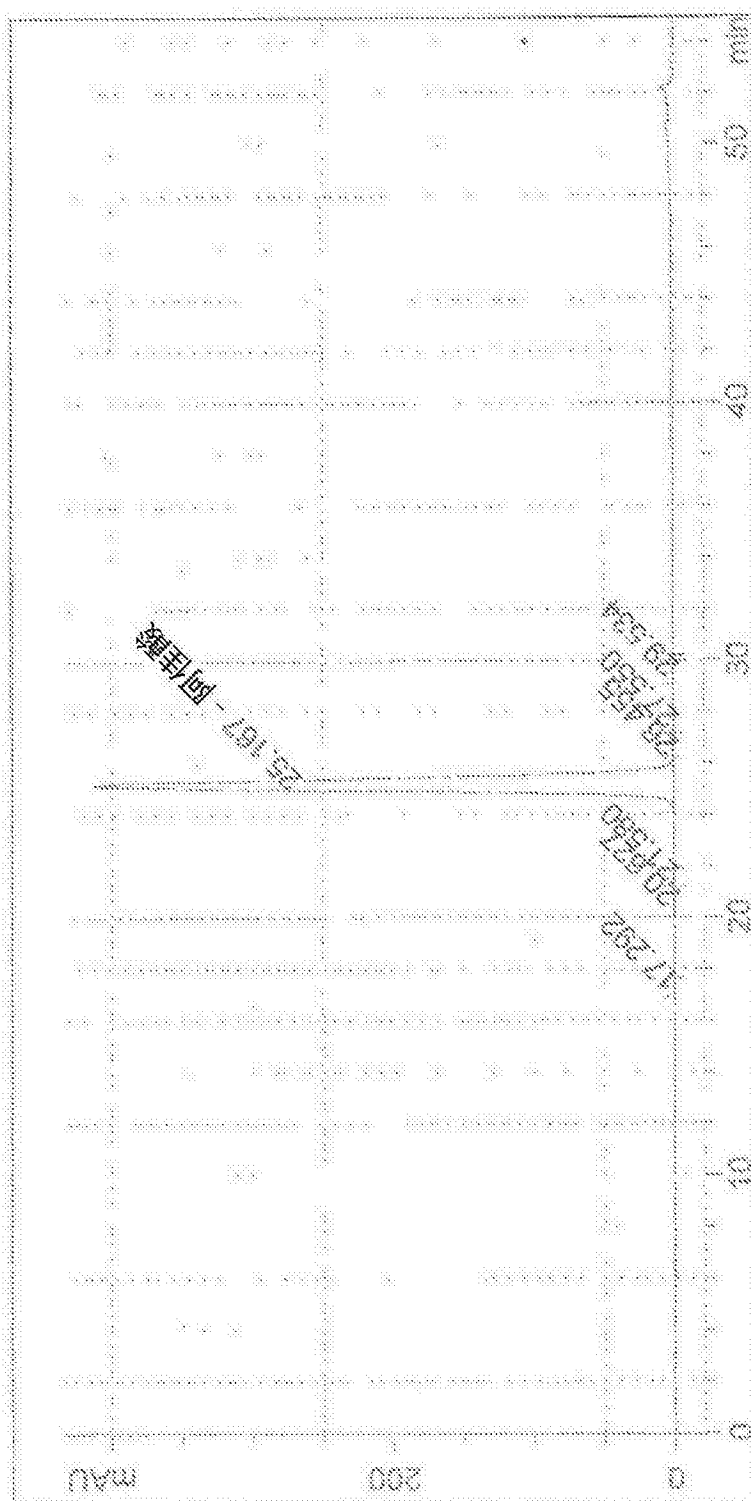


图 6

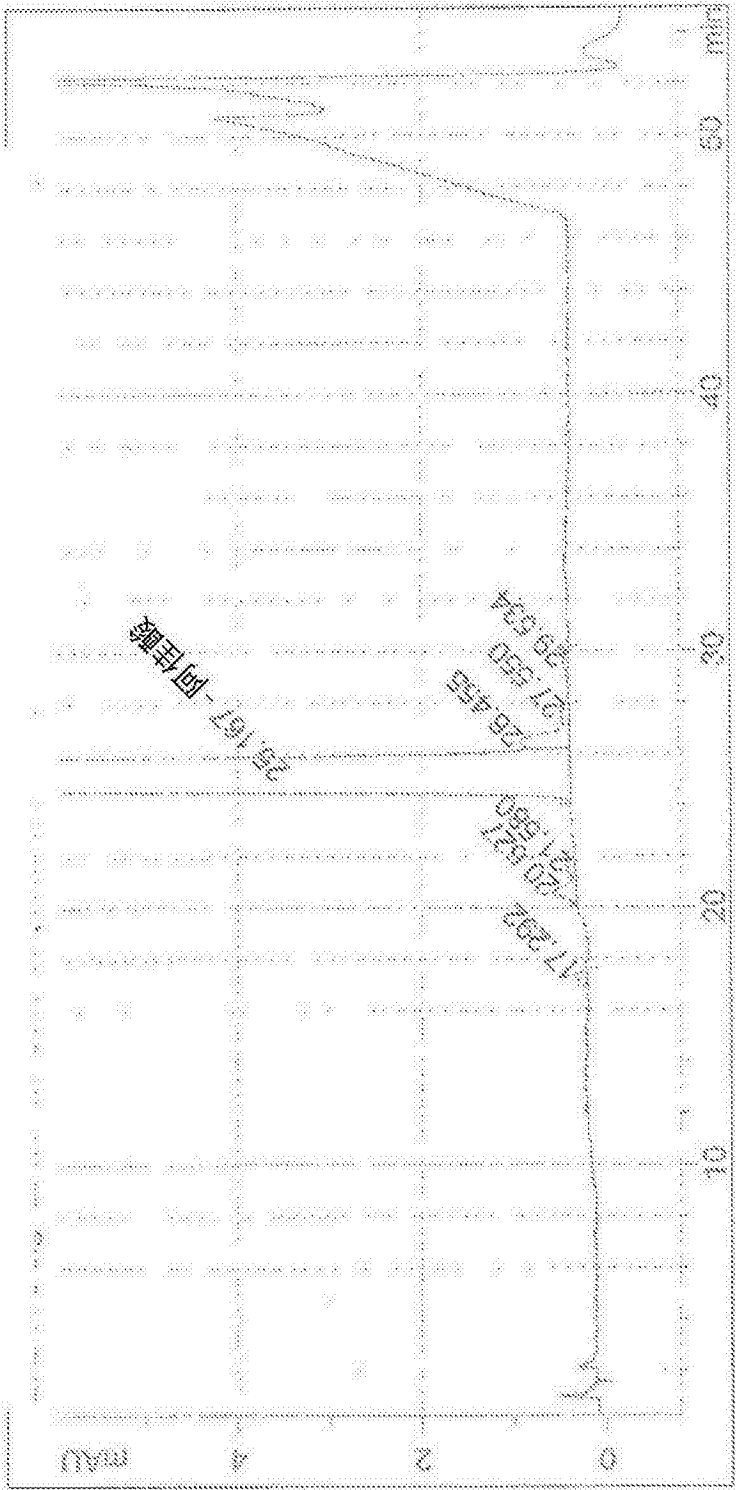


图 7

试验名称		规格	试验结果	数据分析完成日期
物质外观		白色至棕褐色固体	合格 (白色至棕褐色固体)	12年6月13日
鉴定, FTIR		符合参考标准	合格 (符合参考标准)	12年6月4日
鉴定, ¹ H和 ¹³ C NMR		符合参考标准	合格 (符合参考标准)	12年5月31日
鉴定, LCMS		与结构一致	合格 [M+]=401.17 (与结构一致)	12年5月31日
鉴定, 通过HPLC检测的RT		参考标准的保留时间±2%	合格 (参考标准的保留时间±2%)	12年6月14日
含量测定, HPLC		95.0-102.0% w/w (按无水和无溶剂计) ¹	100.2% w/w ¹	12年6月25日
纯度, HPLC		≥ 97.0% AUC	99.8% AUC	12年6月14日
相关杂质, HPLC				
个体相关杂质	各自≤ 0.50% AUC	RRT	结果	12年6月14日
		0.82	0.06%	
		1.05	0.14%	
总相关杂质		≤ 3.0% AUC	0.2%	
残留溶剂 GC-HS	乙腈	≤410 ppm	69 ppm	12年6月18日
	THF	≤720 ppm	ND	
	甲苯	≤890 ppm	ND	
	丙酮	≤6000 ppm	29 ppm	
	IPA	≤6000 ppm	25 ppm	
	庚烷	≤6000 ppm	8 ppm	
	MTBE	≤6000 ppm	164 ppm	
	叔丁醇	≤6000 ppm	ND	
水含量, KF		报告结果	1.0%	12年6月5日
炽灼残渣		报告结果	0.12% w/w	12年5月31日
熔点范围, DSC		报告结果	开始: 92.75 °C 峰值: 99.03 °C	12年6月5日
金属分析, ICP-MS		报告结果	USP35 <231> 中所列元素: ND ²	12年6月14日
硒含量, ICP		≤50 ppm	21 ppm	12年6月14日

图 8

对于所选的大麻素的亲和常数			
配体	K _i CB2	K _i CB1	K _i CB1/K _i CB2
AJA (JBT-101)	51 (31,82)	628 (150, 2500)	12.3
AJA (AMRI)	43 (22, 84)	582 (300, 1250)	13.5
AJA (753 专利) ³	170.5 ¹	32.3 ¹	0.19
WIN-55,212	0.3 至 16.2 ²	1.9 至 123 ²	ND
SR144528	0.3 至 5.6 ²	50.3 至 >10,000 ²	ND
SR141716	514 至 13,200 ²	1.8 至 12.3 ²	ND

JBT-101和AMRI制剂的结合数据用3至11个独立实验的平均值±(范围)来表示。

¹数据来自Rhee等人, 1997年。²数据来自Pertwee等人, 2010年。*如使用[³H]-CP 55,940的方法中描述的那样进行放射性配体结合。所有值均采用nM单位。³美国专利号5,338,753。

1. Rhee, M. H.; Vogel, Z.; Barg, J.; Bayewitch, M.; Levy, R.; Hanus, L.; Breuer, A.; Mechoulam, R. *J Med Chem* **1997**, 40, 3228.
2. Pertwee, R. G.; Howlett, A. C.; Abood, M. E.; Alexander, S. P.; Di Marzo, V.; Elphick, M. R.; Greasley, P. J.; Hansen, H. S.; Kunos, G.; Mackie, K.; Mechoulam, R.; Ross, R. A. *Pharmacol Rev* **2010**, 62, 588.

图 9

小鼠的僵住作用^a

治疗	剂量 (mg/kg)	反应 $\pm$ SD
媒介物 ^b	—	7.7 $\pm$ 4.4
1a	0.1	22.9 $\pm$ 10.3*
3a	0.1	5.8 $\pm$ 3.4
3a (AJA)	1.0	12.2 $\pm$ 6.0
6a	0.25	12.3 $\pm$ 10.3
6a	0.5	13.8 $\pm$ 7.9
6a	1.0	10.4 $\pm$ 10.6
6a	4.0	8.7 $\pm$ 5.6
Δ^6 -THC-7-羧酸	5.0	10.1 $\pm$ 6.8
Δ^6 -THC-7-羧酸	0.5	10.0 $\pm$ 7.5
Δ^1 -THC	40	48.9 $\pm$ 16*

^a值表示为小鼠保持不动的时间段的平均值 $\pm$ SD。其他细节参见实验部分。星号(*)表示通过ANOVA检验为95%显著性；其他为统计学上非显著的。^b经口给予的花生油(50 μ L)。

抗伤害感受作用^a

剂量 (mg/kg)	2a	1a	6b	3e	6a	3a
0.025	—	—	—	—	10.3(5)	20.8(5)
0.050	—	—	—	—	61.7(5)*	85.0(5)*
0.10	—	—	—	—	49.5(20)*	68.3(5)***
0.25	30.0(5)*	44.4(5)*	10.4(5)	—	61.5(17)***	31.4(5)*
0.50	72.5(5)***	58.3(5)**	49.0(10)*	-2.8(8)	51.7(8)*	34.0(5)
1.0	-10.2(5)	106.1(5)*	61.4(15)*	—	14.7(5)	28.4(5)
2.0	—	—	37.5(10)	42.9(9)	—	—
4.0	—	—	3.1(10)	—	—	—

^a值是潜伏期的变化百分比。括号中的数字为小鼠数目，通过配对t检验，*P<0.05；**P<0.01；***P<0.005；其他为统计学上非显著的。在相同条件下，吲哚美辛(10 mg/kg)给出51.1%的潜伏期增加，萘普生(40 mg/kg)产生64.4%的增加。

图 10

全身施用后大鼠血浆和脑中的大麻素水平

	CT-3		WIN55,212-2		Δ^9 -THC	
	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h
血浆	1378 $\pm$ 120	936 $\pm$ 75	150 $\pm$ 17	104 $\pm$ 22	156 $\pm$ 19	178 $\pm$ 25
脑	455 $\pm$ 103	390 $\pm$ 15	197 $\pm$ 27	203 $\pm$ 40	154 $\pm$ 13	184 $\pm$ 33
脑/血浆比	0.3	0.4	1.3	1.9	1.0	1.0

通过HPLC/MS测量口服施用CT-3 (3 mg/kg) 或皮下施用WIN55, 212-2和 Δ^9 -THC (10 mg/kg) 后获得的大鼠血浆和脑样品中的浓度。数据显示为每个时间点三只大鼠的平均值 $\pm$ SEM。

表格来自Dyson等人, Pain 116: 129-137 (2005)。

图 11

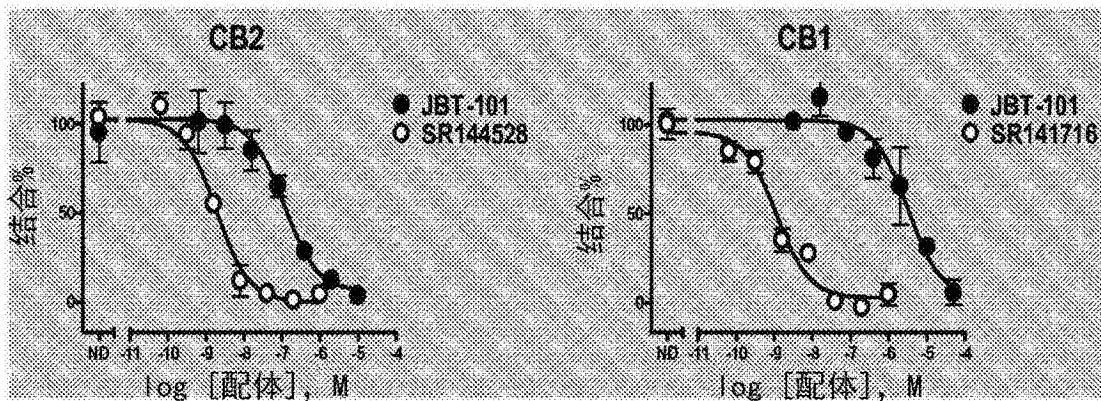


图 12

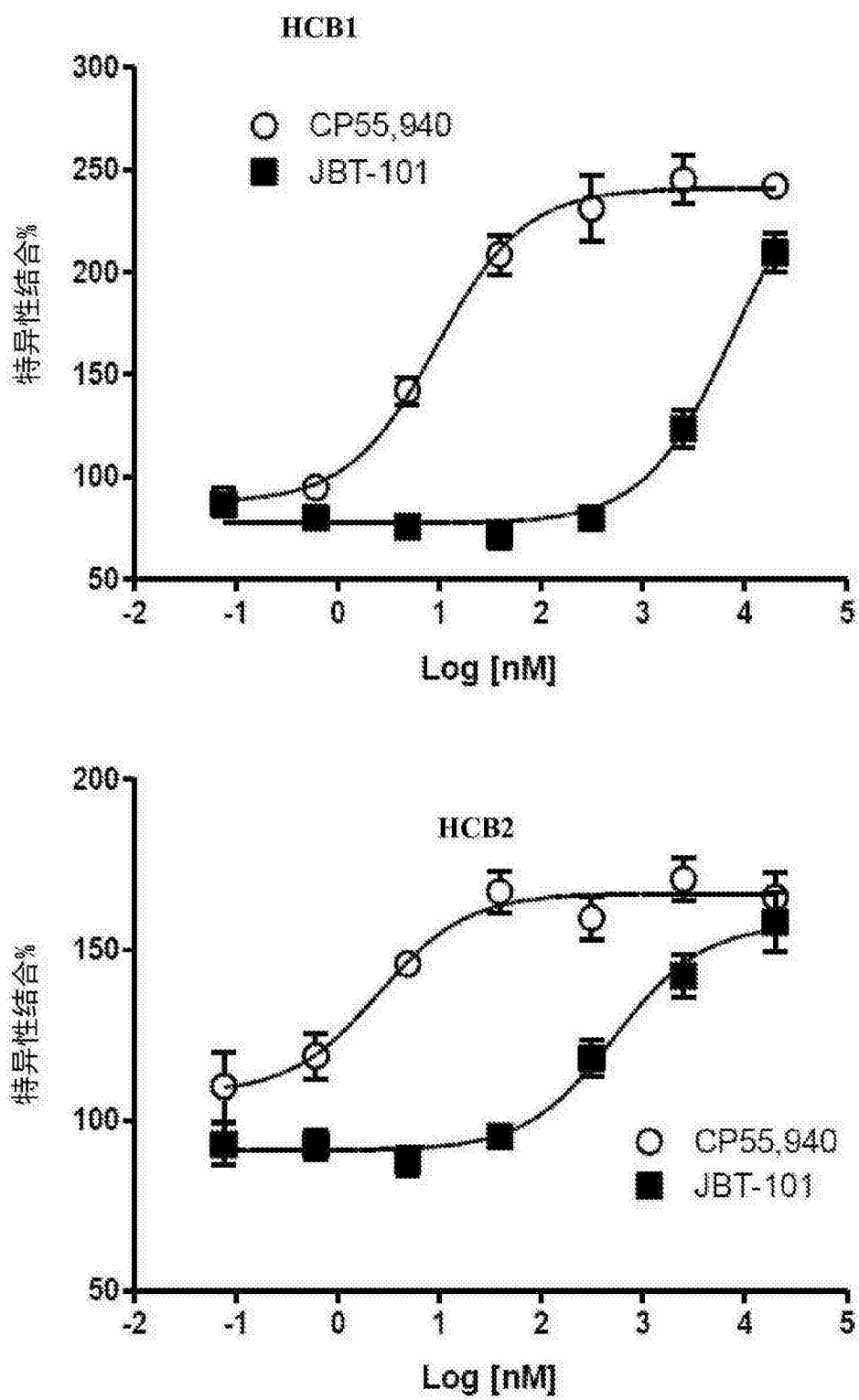


图 13

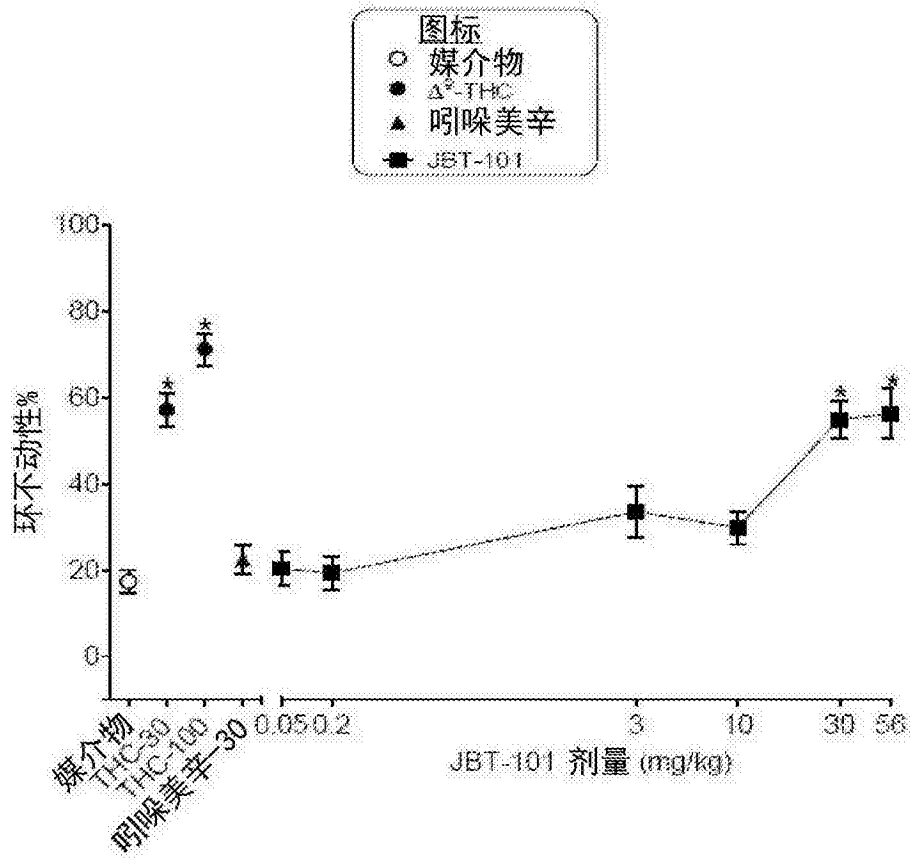


图 14

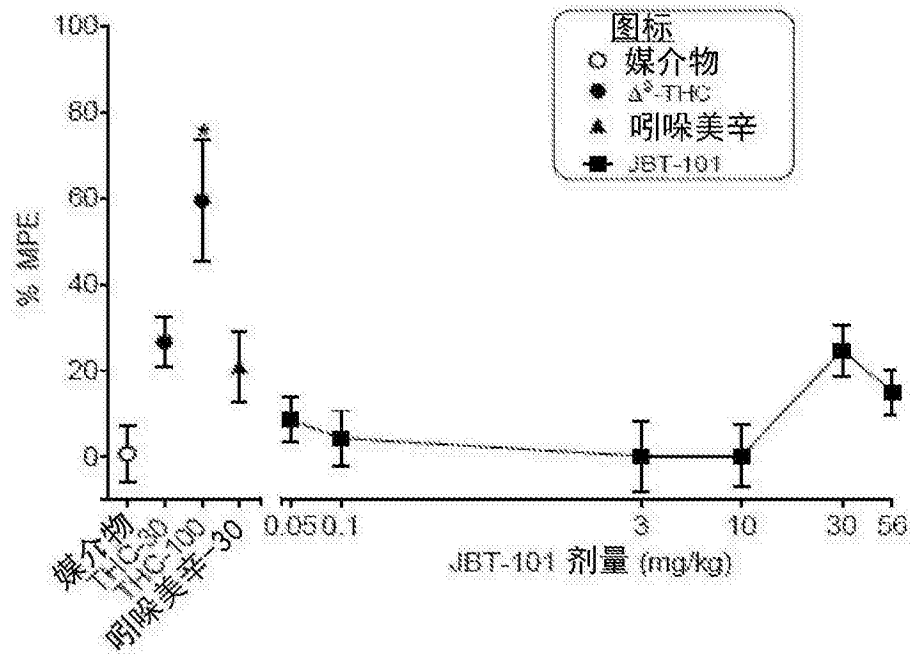


图 15

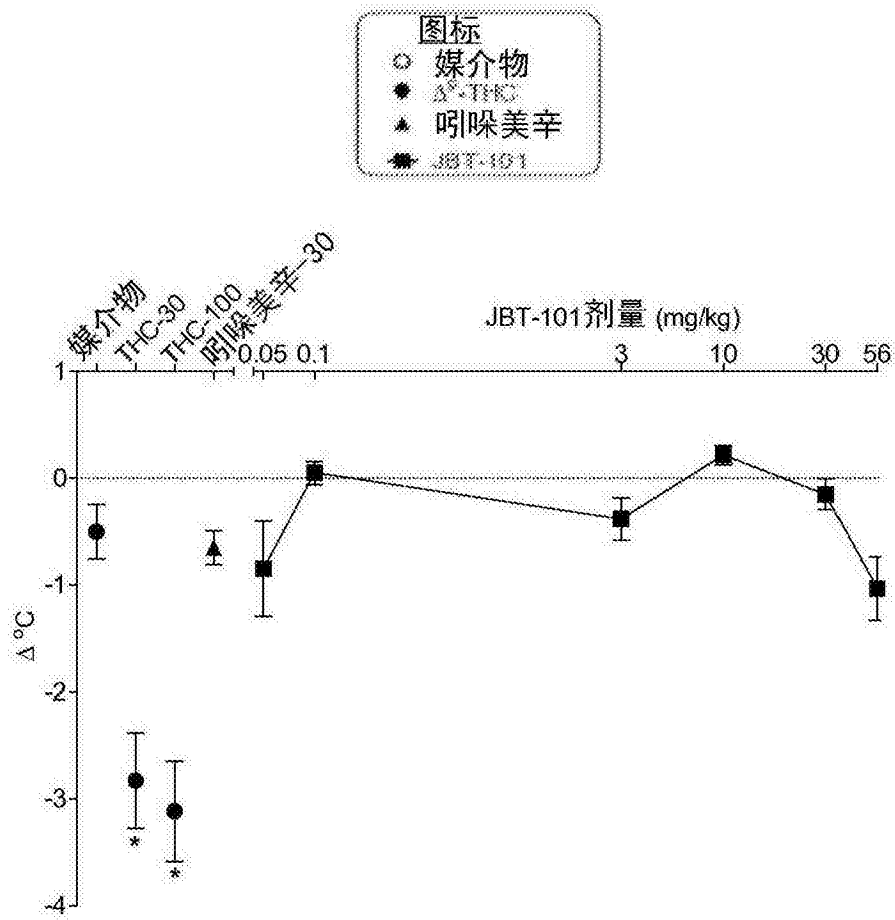


图 16

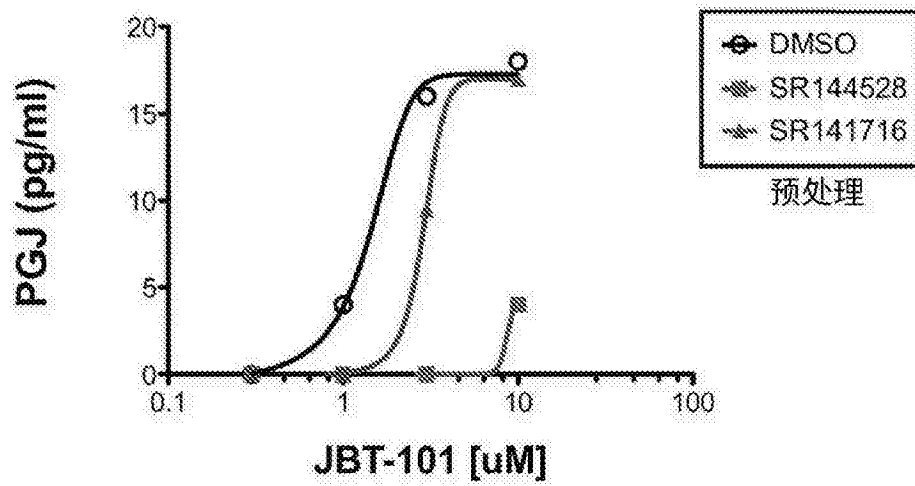
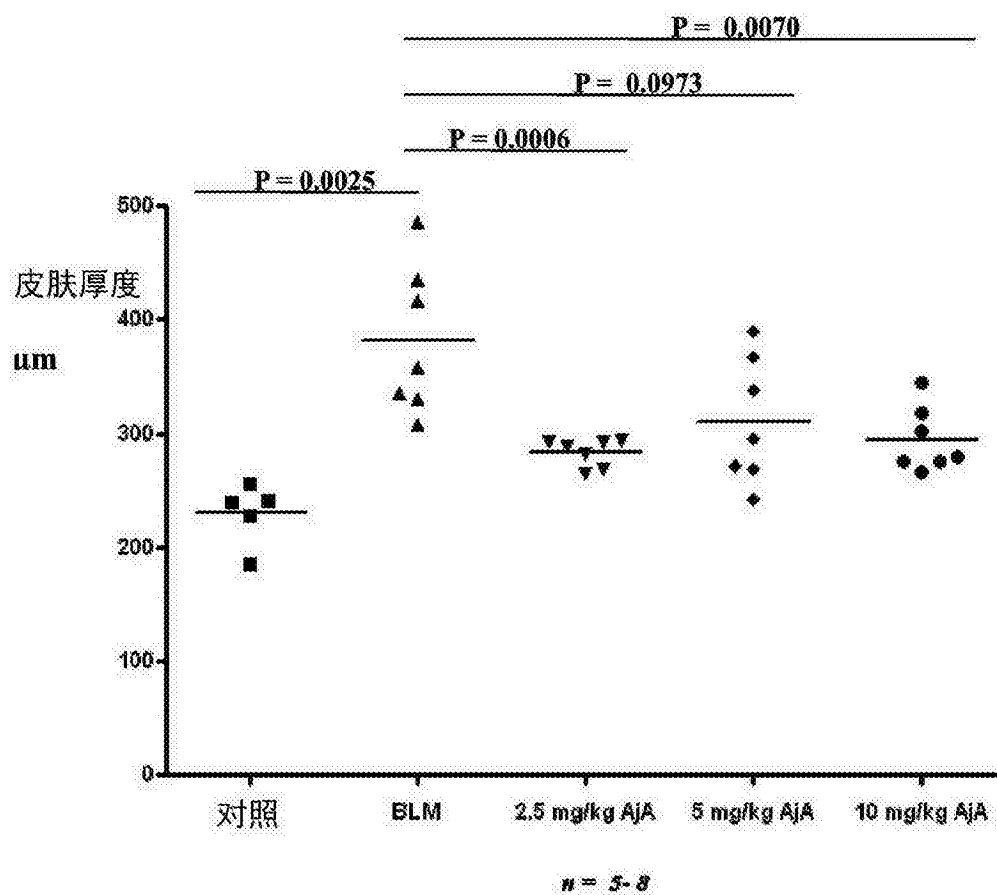


图 17



统计学：非参数/t-检验 - 曼-惠特尼检验 - 双尾P值

图 18

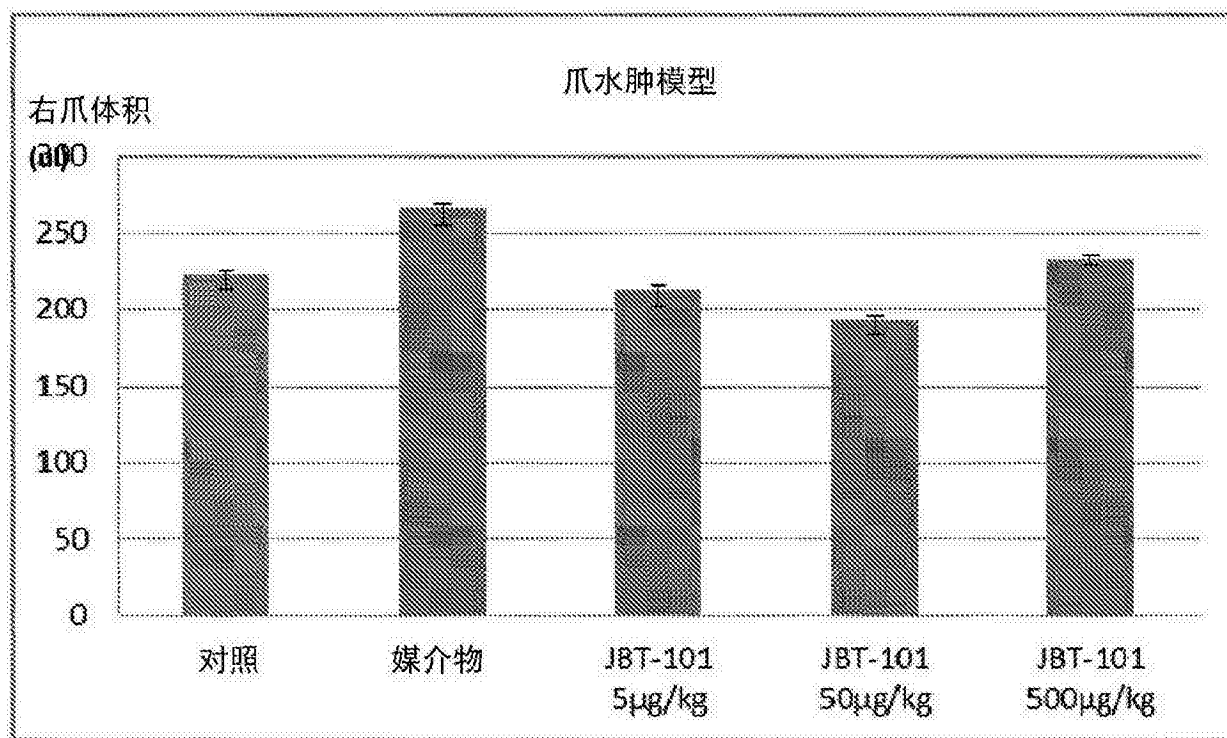


图 19