(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103108634 A
(43)申请公布日 2013.05.15

(21)申请号 201180037004.1

(22)申请日 2011.03.28

(30)优先权数据
2140/CHE/2010 2010.07.28 IN
525/CHE/2011 2011.02.23 IN

(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.01.28

(86)PCT申请的申请数据
PCT/IN2011/000210 2011.03.28

(87)PCT申请的公布数据
WO2012/014218 EN 2012.02.02

(71)申请人 幽兰化学医药有限公司
地址 印度泰米尔纳德金奈

(72)发明人 S·纳拉亚南 J·穆坎
J·库拉辛格尔 S·纳拉亚南
G·辛格 G·巴拉苏布拉玛尼安

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
代理人 张广育 姜建成

(51)Int.Cl.
A61K 31/426(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)

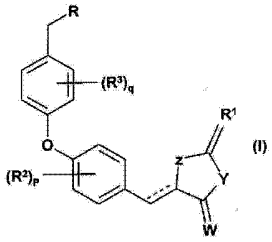
权利要求书2页 说明书23页 附图21页

(54)发明名称

用于治疗肝病、肺病、糖尿病并发症和心血管疾病的二苯醚化合物

(57)摘要

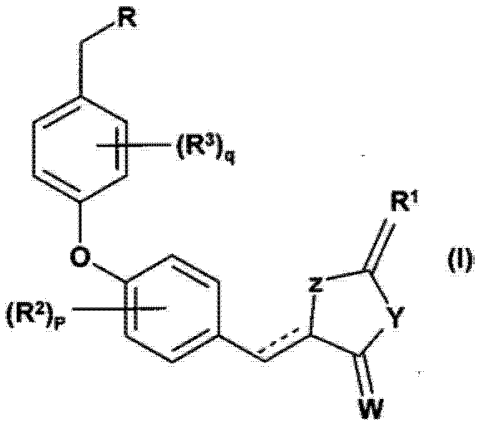
本文提供了式(I)的化合物、其衍生物、类似物、互变异构形式、立体异构体、多晶型物、水合物、溶剂合物、可药用盐以及其组合物、代谢产物和前药，其可用于治疗肝病例如非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和其他肝脏的纤维化疾病；糖尿病并发症，例如大血管并发症(缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病)和微血管并发症(白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼)；以及心血管疾病，例如动脉粥样硬化、再狭窄、高血压、血管痉挛和心脏肥大；以及肺病和肺纤维化。



(I)

CN 103108634 A

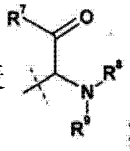
1. 一种式(I)的化合物、其衍生物、类似物、互变异构形式、立体异构体、多晶型物、水合物、溶剂合物、可药用盐、可药用组合物、代谢产物及前药，用于预防或治疗肝病及相关疾病、肺病及相关疾病、糖尿病并发症及心血管疾病，包括给予需要其的受试者治疗有效量的式(I)的化合物；



(I)

其中 ---- 代表任选的键；W 代表 O 或 S；Y 代表 NR^4、S 或 O；其中 R^4 代表氢，取代或未取代的选自烷基、烯基和芳基的基团，反离子或 $-CH_2COR^6$；其中 R^6 代表 -OH、$-NH_2$、-NHOH 或 OR^{18}；其中 R^{18} 是烷基；Z 代表 CR^5 或 S；R^1 代表 O、S 或者与 R^5 一起形成含有碳原子或者 1 或 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的稠合 5 元或 6 元芳香环或杂芳环系统；R^2、R^3 和 R^5 独立地代表氢、卤素、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、烷基、卤代烷基或烷氧基；

R 代表 U 或 V；其中 U 代表氢、卤素、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、$-COR^{10}$，或者取代或未取代的选自直链或支链(C_1-C_6)烷基和(C_1-C_6)烷氧基的基团；R^{10} 代表 $-OR^{11}$ 或 $-NR^{12}R^{13}$；其中 R^{11} 代表氢、取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、芳烷基和杂芳基的基团，或反离子；R^{12} 和 R^{13} 独立地代表氢、取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基和杂芳基的基团；或者 R^{12} 和 R^{13} 一起形成杂脂环或杂芳环；

V 代表 

；

R^7 代表 $-OR^{14}$，其中 R^{14} 代表氢，取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、芳烷基和杂芳基的基团，或者反离子；或者 $-NR^{15}R^{16}$；其中 R^{15} 和 R^{16} 独立地代表氢，或取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基和杂芳基的基团；R^8 和 R^9 独立地代表氢，取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基和杂芳基的基团，或 $-COR^{17}$；其中 R^{17} 代表取代或未取代的选自烷基、芳基、杂芳基、烯基、烯氧基、芳氧基、烷氧基和芳烷氧基的基团；

p 和 q 是选自 1-3 的整数。

2. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述式(I)的化合物选自：

i. (2S)-2-氨基-3-(4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基)甲基]苯氧基}苯基)丙酸甲酯或其盐；

ii. (2S)-2-氨基-3-(4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基)甲基]苯氧基}苯基)丙酸或其盐，以及

iii. (4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基)甲基]苯氧基}苯基)乙酸或其盐。

3. 权利要求 2 使用的化合物，其中所述盐选自氢氯酸盐、氢溴酸盐、钠盐、钾盐或镁盐。

4. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述化合物是 (2S)-2- 氨基 -3-(4-{4-[(2,4- 二氧 -1,3- 噻唑烷 -5- 基）甲基］苯氧基｝苯基）丙酸甲酯的氢氯酸盐。

5. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述化合物是 (2S)-2- 氨基 -3-(4-{4-[(2,4- 二氧 -1,3- 噻唑烷 -5- 基）甲基］苯氧基｝苯基）丙酸的氢氯酸盐。

6. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述化合物是 (4-{4-[(2,4- 二氧 -1,3- 噻唑烷 -5- 基）甲基］苯氧基｝苯基）乙酸。

7. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述化合物是 (4-{4-[(2,4- 二氧 -1,3- 噻唑烷 -5- 基）甲基］苯氧基｝苯基）乙酸的二钠盐。

8. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述肝病选自：非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）、非酒精性脂肪性肝炎（NASH）、肝纤维化、肝硬化和酒精性脂肪性肝炎。

9. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述肝病是 NAFLD 和 NASH。

10. 权利要求 1 使用的化合物，用于治疗 NAFLD 和 NASH。

11. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述糖尿病并发症是选自缺血性心脏病、脑血管疾病和外周血管疾病的大血管并发症，或选自白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼的微血管并发症。

12. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述心血管疾病选自动脉粥样硬化、再狭窄、高血压、血管痉挛和心脏肥大。

13. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述相关疾病选自银屑病、硬皮病、肺转移、肺纤维化、多囊性卵巢综合征和梗阻性呼吸暂停。

14. 权利要求 1 使用的化合物，其中所述糖尿病并发症选自：糖尿病性视网膜病变、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病变和糖尿病性白内障。

15. 权利要求 1 使用的化合物，用于降低血浆或肝脏甘油三酯水平。

16. 权利要求 1 使用的化合物，用于降低血浆葡萄糖水平。

17. 权利要求 1 使用的化合物，用于抑制 TNF-α、IL-6、iNOS、醛糖还原酶和基质金属蛋白酶 -2。

18. 一种含有式（I）的化合物作为活性成分并含有可药用载体的药物组合物，用于治疗权利要求 1 或 2 的肝病及相关疾病、肺病及相关疾病、糖尿病并发症和心血管疾病。

19. 权利要求 2-6 中使用的式（I）的化合物，基本上如前文所描述或例示的。

20. 权利要求 1、8、9、10、11、12、14、15 和 16 中使用的式（I）的化合物，基本上如本文参照实施例和 / 或附图中的图所描述的。

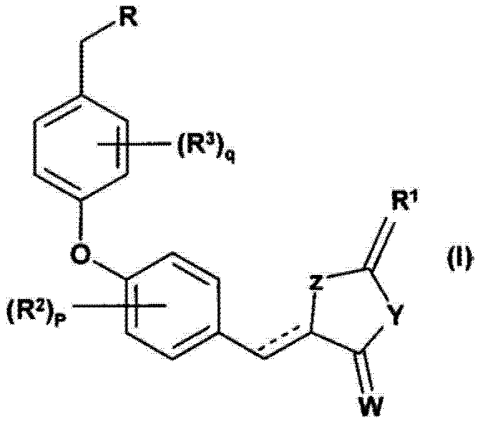
用于治疗肝病、肺病、糖尿病并发症和心血管疾病的二苯醚化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防和治疗肝病的式(I)的化合物,所述肝病例如非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、酒精性脂肪性肝炎(ASH);糖尿病并发症例如大血管并发症(缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病)和微血管并发症(白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼);以及心血管疾病例如动脉粥样硬化、再狭窄、血管痉挛和心脏肥大。

[0002] 本发明公开了使用式(I)的化合物,其衍生物、类似物、互变异构形式、立体异构体、多晶型物、水合物、溶剂合物、可药用盐、组合物、代谢产物及其前药治疗 NAFLD/NASH 的方法。

[0003]



背景技术

[0004] 不饮酒的人或者无其他已知肝病历史的人中的肝脏脂肪变性称为非酒精性脂肪性肝病(NAFLD),其更严重的形式称为非酒精性脂肪性肝炎(NASH)(J Gastrointestin. Liver.Dis.,2007,16,39-46)。NASH 的特征是胰岛素抗性、脂肪变性、以及有或无小叶中心纤维化的坏死性炎症。目前还没有已被确定地证明是 NASH 的有效治疗的药理学疗法(New England Journal of Medicine,2006,355,2297-2307)。

[0005] 通常将 NASH 的发病机理概念化为二次打击(two-hit)过程,其包括肝脏甘油三酯积累(第一次打击),然后是发生导致脂肪性肝炎的氧化应激和细胞因子表达(第二次打击)。

[0006] 多种代谢过程可导致肝细胞的甘油三酯积累,其包括:(1)过量的饮食摄入。饮食中的甘油三酯被以乳糜微粒形式递送到肝脏。此外,作为脂肪储存在脂肪组织中的饮食卡路里呈现为可以以脂蛋白颗粒和游离脂肪酸(FFA)的形式递送到肝脏的脂肪酸和甘油三酯的来源。(2)由肝脏中脂肪酸和甘油三酯的从头合成导致的脂肪生产速率增加。(3)肝脏中脂肪酸 β-氧化的速率下降。(4)胆固醇酯和甘油三酯作为极低密度的脂蛋白(VLDL)从肝脏中排出的速率下降。胰岛素抗性与增加的脂解作用、降低的餐后摄取以及脂肪酸在脂肪

组织中的储存有关，导致脂肪酸向肝脏的流入增加。相应地，增加的肝脏脂肪含量导致肝脏胰岛素抗性。血内胰岛素过多症诱导甾醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)的表达，并且高血糖激活碳水化合物应答元件结合蛋白(ChREBP)，两者都可增加肝脏脂肪酸合成(World J Gastroenterol，2008，14(1)，22-28)。

[0007] 细胞因子是NASH发病中“第二次打击”的有吸引力的候选者。它们能够产生NASH的所有经典组织学特征，其包括肝细胞死亡/凋亡(肿瘤坏死因子-α(TNF-α))、中性粒细胞趋化性(IL-8)以及肝脏星形细胞激活(TNF-α、转化生长因子-β (TGF-β))。此外，还已证明与肥胖的对照相比，患有NASH的患者在肝脏和脂肪组织中TNF-α 和mRNA表达均增加，并且所述过表达与组织学严重度相关(Current science，2006，90(5)，10)。

[0008] 此前有足够文献显示NAFLD与代谢综合征强相关，并且认为肥胖症和糖尿病是发生NAFLD的两个主要危险因素。与无脂肪肝的那些人相比，患有代谢综合征和NAFLD的患者具有因心血管疾病死亡的较高风险(Nature Reviews Drug Discovery，2009，8，361-367)，并且NAFLD是2-型糖尿病发病的一个预报因子。在这些渐进式的多因素事件中，胰岛素和胰岛素抗性均起到十分重要的作用。事实上，胰岛素抗性存在于约98%的NAFLD患者中。基于这些病理-生理事件，对NAFLD的治疗需调节肌肉和脂肪组织中的脂质代谢，并因此通过矫正胰岛素抗性来减少FFA进入肝脏，和/或调节肝内的脂质和碳水化合物代谢以阻止FFA的新合成(Expert.Opin.Emerging.Drugs.，2008，13，1-14)。

[0009] 由于多种原因，NAFLD表现为一种特殊的激发。该疾病的确切流行程度未知，但是其与高度流行的病症(肥胖症、2-型糖尿病、血脂障碍)的相关性表明很多受试者处于患该病的风险。NAFLD标记物例如丙氨酸氨基转移酶并未被广泛接受，因为渐进式肝病也可能存在于具有正常酶水平的受试者中。老年NAFLD患者可具有多种代谢缺陷，并且与肝病相比，他们的最终预后受到所述代谢综合征的心血管并发症的影响更严重(Best Practice&Research Clinical Gastroenterology，2004，18，1105-1116)。

[0010] 目前没有可治疗肝脏脂肪变性或NASH的具体药物，尽管有通过使用抗糖尿病/胰岛素敏感试剂(二甲双胍(Metformin)、吡格列酮(Pioglitazone)、和罗西格列酮(Rosiglitazone))、抗高脂血试剂(心血安(Clofibrate)、诺衡(Gemfibrozil)、阿托伐他汀(Atorvastatin)、普伐他汀(Pravastatin)、和普罗布考(Probucol))、抗肥胖试剂(奥利司他(Orlistat))以及细胞保护试剂(熊脱氧胆酸(Ursodeoxycholic acid)，UDCA)进行人体研究的报道(Expert.Opin.Emerging.Drugs.2008，13，1-14)。用罗西格列酮进行的临床试验(每天两次4mg，48周)显示肝细胞气球样变、胰岛素敏感度以及血清转移酶平均水平显著改善，但是67%的患者体重增加并且体重增加的中间值为7.3%(Hepatology，2003，38，1008-1017)。在NASH患者中使用吡格列酮进行了另一项初步研究，其中每天用30mg吡格列酮治疗所述患者，共48周。虽然组织学特征有改善，但是主要的副作用是体重增加和身体肥胖增加(Hepatology2004，39，188-196)。

[0011] 用甜菜碱(来自对胆碱的饮食来源的氧化)进行了随机安慰剂-对照研究，其中所述NASH患者每天接受20g甜菜碱，共12个月。但是，该处理未能提高下降的血清抗氧化状态、胰岛素抗性以及脂连蛋白的水平(Hepatology，2009，50(6)，1818-1826)。进行了包含二甲双胍的初步研究(患者接受2g/天，共48周)。体重下降和NASH活性指数的改善之间有显著相关。此外，胰岛素敏感性也有提高，但是其不伴随组织学改变。治疗过程中体重持续

下降且丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平持续提高,但是停止治疗后体重立即增加,然后氨基转移酶水平提高(Aliment Pharmacol Ther.,2008,29,172-192)。

[0012] 用阿托伐他汀(HMG-CoA 还原酶抑制剂)进行的初步临床试验显示总胆固醇(chlolesterol,TC)和总甘油三酯(TG)水平提高,这是其他药物未显示的。这似乎是患有 NASH 的肥胖/血脂障碍患者的首选。但是,其未显示出血糖水平和体重指数(BMI)的显著改善。用己酮可可碱(Pentoxifylline)(PDE4 抑制剂)进行的另一初步临床试验显示处理 10 周后 ALT 和 γ-谷氨酰转肽酶(GGT)快速且深深降低,而不影响其他生物化学参数,并且整个监视过程中该效应保持稳定。但是,这也没有显著提高血糖水平和 BMI (J Gastrointestin LiverDis,2007,16,39-46)。

[0013] 在一个小的初步研究中,使用抗肥胖药物奥利司他(一种胃脂肪酶和胰脂肪酶的可逆抑制剂,其阻止甘油三酯吸收并促进体重减轻)时显示氨基转移酶的提高,但是血清葡萄糖和脂质谱的改变在统计学上不显著(Aliment Pharmacol Ther,2004,20,623-628)。

[0014] NAFLD 在普通人群(包括所有年龄群体和种族)中具有约 14-30% 的高发病率,而 NASH 的发病率约为 3%。最近,在意大利进行的流行病学研究显示 NAFLD 的发病率持续增加。NAFLD/NASH 患者主要与肥胖症、糖尿病和血脂障碍相关(Expert Opinion on Emerging Drugs2008,13,1-14)。如果任何单独一种化合物对所有的三种适应症(肥胖症、糖尿病和血脂障碍)起作用,则其将是治疗 NAFLD/NASH 的正确选择。因此开发可治疗所有三种适应症的药物可用于治疗 NAFLD/NASH。

[0015] NASH 还与使用某些药物的患者相关。例如,他莫昔芬(Tamoxifen)在全世界范围内在乳癌早期具有雌激素受体阳性的患者中用作抗雌激素试剂。由于暴露于他莫昔芬,在三分之一的不肥胖的乳癌患者中发现了大量的肝脏脂肪变性,并且其中一些患者甚至发展成 NASH (Internal Medicine,2002,41(5),345-350)。

[0016] 在患有轻度或重度向心性肥胖的个体和患有 2 型糖尿病或血脂障碍的受试者中,NAFLD 是非常普遍的(The Journal of Medicine,2004,62,217)。综上所述,显然目前没有治疗 NAFLD/NASH 的特定药物。市售的试图用于治疗 NAFLD/NASH 的其他药物受困于副作用。显然,治疗 NAFLD/NASH 的需求并未得到满足,并且急需鉴别出可显著治疗 NAFLD/NASH 而不引起上述不希望/副作用的化合物。

[0017] 已经在三分之一的非酒精性脂肪性肝炎患者中发现肝纤维化的发展(Hepatolog,2004,4,820-826)。用目前市场上的常规抗纤维化和抗炎症药物不能成功治疗该慢性疾病,因为它们要么缺乏有效性要么引起太多的副作用。靶向肝脏星形细胞(HSC)的抗纤维化试剂被认为是增加它们治疗潜力的有希望的策略。HSC 占人所有肝细胞的 5-8%,占窦状细胞体积的 13%。星形细胞位于内皮屏障之下的窦周间隙中。急性或慢性肝损伤后,HSC 被激活并进行形成肌成纤维细胞表型的转分化。受到刺激后,所述细胞开始转分化为激活的星形细胞,其在肝脏中分泌致纤维因子,包括胶原。胶原分泌是激活的 HSC 的显著特性。激活的 HSC 过表达胶原是肝纤维化发展中的重要步骤。因此,将激活的 HSC 作为阻止肝纤维化发展的靶细胞并不奇怪。事实上,目前正在评估的多数抗纤维化治疗是针对抑制 HSC 的活性、增殖、或其合成产物(J Gastroenterol,2000,35,665-662)。纤维化——其特征在于胶原病理地积累——越来越多地被认为是许多慢性疾病(如上述疾病)的重要特征,由于市售的用于治疗肝纤维化的常规抗纤维化和抗炎症药物缺少所需的有效性或者具有

副作用，需要开发可克服上述缺陷的药物。

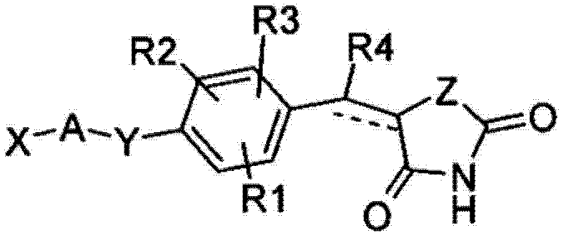
[0018] 糖尿病并发症可分为大血管并发症（缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病）和微血管并发症（白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼），并且其可由多元醇（例如山梨醇）积累、自由基过氧化以及蛋白质在赖氨酸残基位点的葡萄糖基化引起。高血糖可引起多种被认为能够引发糖尿病并发症的生物化学异常。增加的细胞内葡萄糖浓度激活醛糖还原酶，该酶可将葡萄糖转变为山梨醇（The Journal of the American Medical Association，2002，288，2579-88）。葡萄糖还原为山梨醇是一种能量依赖的过程，并且过高的酶活导致氧化应激，其可引起细胞功能障碍和损伤。葡萄糖非酶地连接到蛋白质，导致形成可引起细胞功能障碍和损伤的晚期糖化终产物。在细胞内信号中起重要作用的蛋白激酶C（PKC）的激活可改变基因表达和蛋白功能，这导致细胞损伤和功能障碍。所述醛糖还原酶途径、晚期糖化终产物途径和PKC途径是相互关联的。所有这些途径均被认为可引起视网膜血管内皮细胞功能障碍和损伤，导致非正常细胞生长和存活、增加的血管渗透性、改变的血液流动、缺血、非正常血管发生以及导致与糖尿病并发症相关的基底基质增厚。这些途径是糖尿病并发症治疗的目标。

[0019] 促炎症反应核转录因子（核因子－κB（NF-κB）、激活的T-细胞的核因子（NFAT）、激活蛋白因子-1（AP-1））的上调可导致炎性分子例如炎性白介素、生长因子、可诱导的一氧化氮合成酶（iNOS）以及蛋白水解酶的表达和产生。已将这些分子与眼角膜中的心血管形成相关联，这表明上述转录因子可能是抑制血管生产改变的靶标（Recent Prog. Horm. Res.，2001，56，239-263；J. Mol. Med.，2001，79，30-47；J. Clin. Invest，2002，110，923-932；J Endocrinol，2001，169，453-459；J Biol. Chem.，2000，275，4541-4544；J Endocrinol，2001，169，461-464）。最近，使用计算工具进行多序列比对的研究（Medical Hypotheses，2008，70，148-155）表明醛糖还原酶、血管内皮生长因子（VEGF）、一氧化氮合成酶（NOS）、胎盘生长因子（PlGF）、晚期糖化终产物-AGE受体（AGE-RAGE）、血管生成素和糖尿病并发症致病过程中的细胞因子之间密切相关，因此，多分支方法可有效预防此病况。此外，TNF-α是I型糖尿病患者中增生性糖尿病性视网膜病变（PDR）的标记物（J. Diab. Comp.，2008，22309-316），这表明抑制脂多糖（LPS）诱导的TNF-α是治疗糖尿病并发症的有用工具。

[0020] 对糖尿病并发症的研究表明多种机制参与该病的致病过程，因此在糖尿病并发症的长期治疗中针对单个机制的作用可能是无效的。因此，需要针对多个靶标（包括但不限于醛糖还原酶、iNOS、TNF-α和IL-6）的治疗糖尿病并发症的化合物，并且需要满足这些条件的新的分子。

[0021] US6794401B2公开了式（II）的化合物，其互变异构体、立体异构体、多晶型物、可药用盐、可药用溶剂合物，其中---代表任选的双键；

[0022]

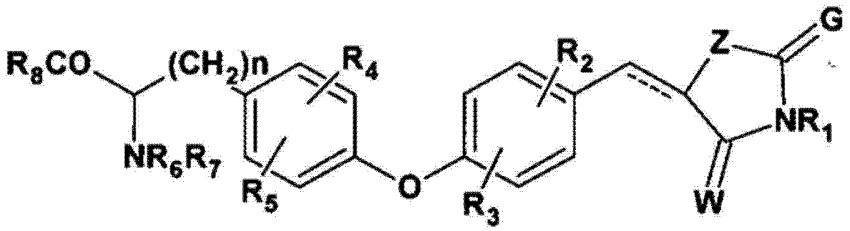


(II)

[0023] Y 代表 O、S 或 NR，其中 R 代表氢或烷基；Z 代表 O 或 S；R_1、R_2、R_3 和 R_4 可相同或不同，并可独立地代表氢、卤素、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、烷基或烷氧基；A 代表键或者取代或未取代的选自芳基、杂环基和杂芳基环的基团；X 代表 α－氨基羧酸或通过其 α－侧链键合到 A 或 Y 的 α－氨基羧酸衍生物。

[0024] US7521465B2 公开了式（III）的化合物，其类似物、互变异构体、立体异构体、多晶型物、可药用盐、可药用溶剂合物，其中 ---- 代表任选的双键；W 代表 O 或 S；Z 代表 CR_{10}、O 或 S;

[0025]

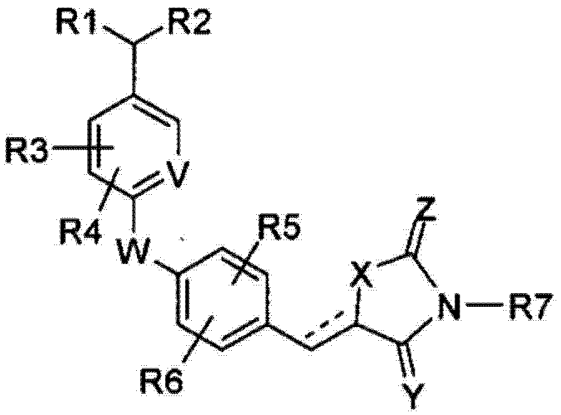


(III)

[0026] G 代表 O、S 或与 R_{10} 一起形成含有 1 个或 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的 5 元或 6 元芳香环或杂芳环系统；n 代表 1。R_2、R_3、R_4 和 R_5 选自氢、卤素、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、取代或未取代的选自直链或支链的（C_1-C_6）烷基、（C_1-C_6）烷氧基的基团。R_6 和 R_7 可相同或不同，并独立地代表 H、取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、杂芳基、杂环基和 COR_{12} 的基团；其中 R_{12} 代表取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、烯氧基、芳氧基、烷氧基、芳烷基和芳烷氧基的基团。R_8 代表 $-OR_{13}$ 或 $NR_{14}R_{15}$，其中 R_{13} 代表氢、取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、芳烷基、杂芳基和反离子的基团；R_{14} 和 R_{15} 可相同或不同，并可独立地代表氢、选自烷基、烯基和芳基的基团。R_1 代表氢、取代或未取代的选自烷基、芳基、烯基、反离子和 $-CH_2COOR$ 的基团；其中 R 代表 H 或（C_1-C_6）烷基。R_{10} 任选地与 G 一起形成 5- 元或 6- 元芳香环或杂芳环系统例如酚基、呋喃基、吡咯基、吡啶基等。

[0027] US7781464B2 公开了式（IV）的化合物及其可药用盐，其中

[0028]



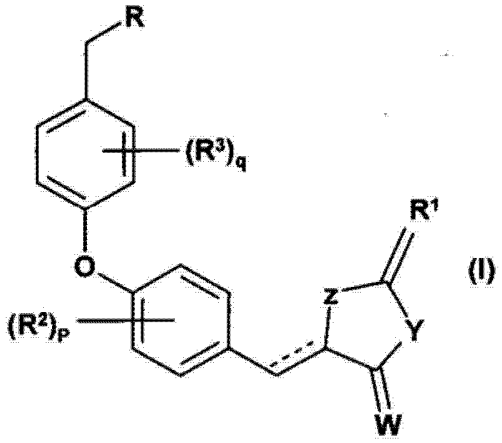
(IV)

[0029] “----”代表任选的键；V 代表 CH 或 N；Y 代表 O 或 S；W 代表 O 或 NR_8；R_8 选自氢或者取代或未取代的直链或支链（C_1-C_6）烷基；X 代表 CR_9、O 或 S；其中 R_9 是氢或 R_9 与 Z 一起形成含有 1 到 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的 5 元或 6- 元芳香环或杂芳环系统；Z 代表 O、S 或与 R_9 一起形成含有 1 到 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的 5 元或 6- 元芳香环或杂芳环系统；R_1 和 R_2 可相同或不同，并可独立地选自氢、卤素、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、COR_{10}、

取代或未取代的选自直链或支链的(C_1-C_6)烷基和(C_1-C_6)烷氧基的基团;R_{10}代表-OR_{11}或$NR_{12}R_{13}$;其中R_{11}、R_{12}和R_{13}的定义见该专利;R_3、R_4、R_5和R_6的定义见该专利;R_7代表氢、取代或未取代例如烷基、烯基、-CH_2COOR、芳基和反离子的基团;其中R代表H或(C_1-C_6)烷基。

[0030] 式(II)、(III)和(IV)的化合物由通式(I)代表。

[0031]



[0032] 发明目的

[0033] 本发明的目的是提供式(I)的化合物,用于预防和治疗肝病及相关病症、纤维化和糖尿病并发症例如大血管并发症(缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病)和微血管并发症(白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼);包括给予治疗有效量的式(I)的化合物。

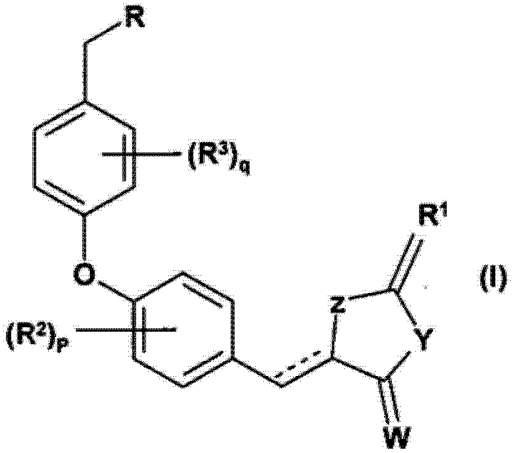
[0034] 本文的另一个目的是提供预防和治疗肝病及相关病症纤维化和糖尿病并发症例如大血管并发症(缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病)和微血管并发症(白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼)的方法;包括给予治疗有效量的式(I)的化合物。

[0035] 本发明的另一个目的是提供式(I)的化合物,用于治疗肝病及相关病症、肺病及相关病症、糖尿病并发症及心血管疾病;提供式(I)的化合物用于治疗NAFLD(非酒精性脂肪性肝病)、NASH(非酒精性脂肪性肝炎)、肝纤维化、肝硬化和酒精性脂肪性肝炎;提供式(I)的化合物,用于治疗缺血性心脏病、脑血管病、外周血管病、白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼;提供式(I)的化合物,用于治疗动脉粥样硬化、再狭窄、高血压、血管痉挛和心脏肥大;提供式(I)的化合物,用于治疗银屑病、肺转移、肺纤维化、硬皮病、多囊性卵巢综合征和梗阻性呼吸暂停;提供式(I)的化合物,用于治疗糖尿病性视网膜病变、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病变、糖尿病性白内障;提供式(I)的化合物,用于降低血浆或肝脏甘油三酯水平和降低血浆葡萄糖水平;提供式(I)的化合物,用于抑制TNF-α、IL-6、iNOS、基质金属蛋白酶-2或醛糖还原酶;提供可药用组合物以治疗所述病症或者至少为公众提供一种可用的选择。

发明内容

[0036] 本发明公开了式(I)的化合物,其衍生物、类似物、互变异构形式、立体异构体、多晶型物、水合物、溶剂合物、可药用盐、可药用组合物、代谢产物及其前药的治疗或使用方法。

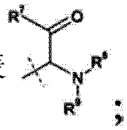
[0037]



[0038] 具体地，本发明提供了式（I）的化合物、其衍生物、类似物、互变异构形式、立体异构体、多晶型物、水合物、溶剂合物、可药用盐、可药用组合物、代谢产物及其前药，用于治疗肝病及相关病症、肺病及相关病症、糖尿病并发症例如大血管并发症（缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病）和微血管并发症（白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼），其中 ---- 代表任选的键；W 代表 O 或 S；Y 代表 NR^4、S 或 O；其中 R^4 代表氢、取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、反离子和 $-CH_2COR^6$ 的基团；其中 R^6 代表 －OH、$-NH_2$、-NHOH 或 OR^{18}；其中 R^{18} 是烷基；Z 代表 CR^5 或 S；R_1 代表 O、S 或与 R^5 一起形成含有碳原子或者 1 或 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的稠合 5 元或 6 元芳香环或杂芳环系统；

[0039] R^2、R^3 和 R^5 独立地代表氢、卤素、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、烷基、卤代烷基或烷氧基；

[0040] R 代表 U 或 V；其中 U 代表氢、卤素、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、$-COR^{10}$ 或者取代或未取代的选自直链或支链（C_1-C_6）烷基和（C_1-C_6）烷氧基的基团；R^{10} 代表 $-OR^{11}$ 或 $-NR^{12}R^{13}$；其中 R^{11} 代表氢、反离子或者取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、芳烷基和杂芳基的基团；R^{12} 和 R^{13} 独立地代表氢或者取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基和杂芳基的基团；或者 R^{12} 和 R^{13} 一起形成杂脂环或杂芳环；

[0041] V 代表  ；

[0042] R^7 代表 $-OR^{14}$；其中 R^{14} 代表氢、取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基、芳烷基、杂芳基、反离子的基团，以及 $-NR^{15}R^{16}$；其中 R^{15} 和 R^{16} 独立地代表氢或者取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基和杂芳基的基团；R^8 和 R^9 独立地代表氢、$-COR^{17}$ 或者取代或未取代的选自烷基、烯基、芳基和杂芳基的基团；其中 R^{17} 代表取代或未取代的选自烷基、芳基、杂芳基、烯基、烯氧基、芳氧基、烷氧基和芳烷氧基的基团；

[0043] p 和 q 是选自 1-3 的整数。

[0044] 在一个优选的实施方案中，描述了式（I）的化合物用于治疗 NAFLD/NASH 和 NAFLD/NASH- 相关病症和病况，包括给予治疗有效量的式（I）的化合物。

[0045] 另一个实施方案中，描述了式（I）的化合物用于治疗 NAFLD/NASH，包括给予治疗有效量的式（I）的化合物。

[0046] 另一个实施方案中，描述了式（I）的化合物用于治疗 NAFLD/NASH，包括给予治疗

有效量的式(A)的化合物。

[0047] 另一个实施方案中,描述了式(I)的化合物用于治疗肝纤维化和肝硬化,包括给予治疗有效量的式(I)的化合物。

[0048] 另一个实施方案中,描述了式(I)的化合物用于治疗 NAFLD/NASH 相关疾病,包括给予治疗有效量的式(I)的化合物。

[0049] 另一个实施方案中,描述了式(I)的化合物用于治疗心血管疾病例如动脉粥样硬化、再狭窄、高血压、血管痉挛和心脏肥大。

[0050] 另一个实施方案中,描述了式(I)的化合物用于治疗糖尿病并发症例如大血管并发症(缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病)和微血管并发症(白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼)。

[0051] 另一个实施方案中,提供了式(I)的化合物用于治疗肺病及相关疾病、肺纤维化及肺转移。

[0052] 另一个实施方案中,提供了式(I)的化合物用于治疗银屑病和硬皮病。

[0053] 另一个实施方案中,提供了具有 IL-6、醛糖还原酶、iNOS、基质金属蛋白酶 -2 和 TNF-α 抑制活性的式(I)的化合物。

[0054] 另一个实施方案中,提供了式(I)的化合物用于降低血浆或肝脏甘油三酯水平和血浆葡萄糖水平。

附图说明

[0055] 图 1: 式(A)的化合物对饮食诱导的肥胖症(DIO)/NAFLD 小鼠体重的作用。

[0056] 图 2: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠体重的作用。

[0057] 图 3: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝脏重量的作用。

[0058] 图 4: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝 TG 水平的作用。

[0059] 图 5: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠(禁食)葡萄糖水平的作用。

[0060] 图 6: 图示为式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝脏组织病理学作用的分级。

[0061] 图 7(7a-7h): 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 模型中肝脏组织病理学变化的作用。

[0062] 图 8: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠体重增加的作用。

[0063] 图 9: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中葡萄糖水平的作用。

[0064] 图 10: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中 ALT 水平的作用。

[0065] 图 11: 式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中的肝脏甘油三酯的作用。

[0066] 图 12: 式(A)的化合物对超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 小鼠中肝细胞空泡形成的作用。

[0067] 图 13: 式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中的肝脏组织病理学的作用。

[0068] 图 14: 式(A)的化合物对 HC-HF (高胆固醇 - 高脂肪)饮食饲喂的仓鼠中甘油三酯水平的作用。

[0069] 图 15: 式(A)的化合物对 HC-HF 饮食饲喂的仓鼠中 NEFA 水平的作用。

[0070] 图 16: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中体重增加的作用。

[0071] 图 17：式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中血浆天冬氨酸氨基转移酶(AST)的作用。

[0072] 图 18：式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中血浆 ALT 水平的作用。

[0073] 图 19：式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝细胞气球样变的作用。

[0074] 图 20：式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝脏脂肪变性的作用。

[0075] 图 21A：式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中的肝脏组织病理学的作用。

[0076] 图 22：式(A)的化合物对 DIO 小鼠中 HOMA-IR 的作用。

[0077] 图 23：式(A)的化合物对 nSTZ 处理的大鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中体重增加的作用。

[0078] 图 24：图示为式(A)的化合物对 nSTZ 处理的大鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中肝脏空泡形成(脂肪变性)作用的分级。

[0079] 图 25：式(A)的化合物对 nSTZ 处理的大鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中肝脏空泡形成(脂肪变性)的作用。

[0080] 图 26：式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化中肺组织病理学的作用。

[0081] 图 27：式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化中肺组织病理学的作用(H&E 染色)。

[0082] 图 28：式(A)的化合物对脂多糖(LPS)激发的 NAFLD/NASH 小鼠中 TNF-α 水平的作用。

[0083] 图 29：式(C)化合物的二钠盐对 HC－HF 饮食饲喂的仓鼠中血浆 TG 的作用。

[0084] 图 30：式(A)的化合物和式(C)化合物的二钠盐对超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 的小鼠中肝细胞气球样变的作用。

[0085] 图 31：式(A)的化合物和式(C)化合物的二钠盐对超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 的小鼠中微空泡形成的作用。

[0086] 图 32：式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中肝脏组织病理学的作用。

[0087] 图 33：式(A)的化合物和式(C)化合物的二钠盐对醇诱导的急性高甘油三酯血症小鼠中血浆 TG 的作用。

[0088] 图 34：式(A)、(B)和(C)的化合物对 3T3-L1 小鼠的成纤维细胞中脂肪形成的作用。

[0089] 图 35a 和 35b：使用蛋白质印迹技术对式(B)和(C)的化合物处理的 HSC 中胶原分泌的评估。

[0090] 图 36：式(B)和(C)的化合物对 HSC 中凋亡的诱导。

[0091] 图 37：式(B)和(C)的化合物对凋亡的诱导是 HSC 选择性的。

[0092] 图 38：对 iNOS 产生的抑制作用。

[0093] 图 39：雄性 ob/ob 瘦对照小鼠经口服给予赋形剂(n=5)和式(A)的化合物(50mg/kg/天，n=4)10 天后的血清 TNF-α 水平(pg/dL)。

[0094] 图 40：雄性 ob/ob 瘦对照小鼠经口服给予赋形剂(n=5)和式(A)的化合物(50mg/

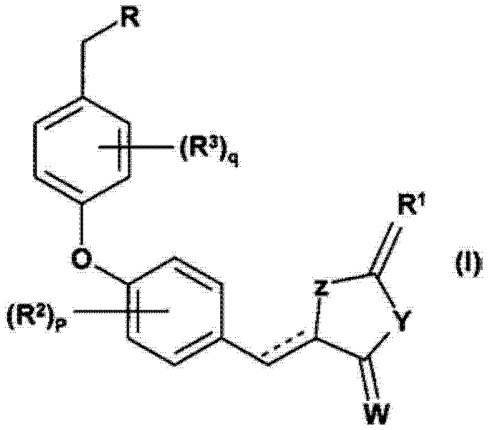
kg/天，n=4）10 天后的血清 IL-6 水平（pg/dL）。

[0095] 图 41：式（A）的化合物对 STZ 诱导的糖尿病大鼠中豆状核变性的作用。

具体实施方式

[0096] 本发明公开了式（I）的化合物，其衍生物、类似物、互变异构形式、立体异构体、多晶型物、水合物、溶剂合物、可药用盐、可药用组合物、代谢产物及其前药，用于预防和治疗肝病及相关疾病、纤维化和糖尿病并发症例如大血管并发症（缺血性心脏病、脑血管病和外周血管病）和微血管并发症（白内障、视网膜病变、肾病、神经病变、黄斑病变和青光眼）。

[0097]



[0098] 其中，---- 代表任选的键；W 代表 O 或 S；Y 代表 NR^4、S 或 O；

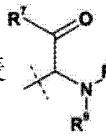
[0099] 其中 R^4 代表氢或者取代或未取代的选自以下的基团：直链或支链的（C_1-C_6）烷基例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等；烯基例如乙烯基、丙烯基、丁烯基等；芳基例如苯基、萘基等；反离子选自碱金属例如 Li、Na、K 等；或者 $-CH_2COR^6$，其中 R^6 代表 -OH、$-N_2$、-NHOH 或 $-OR^{18}$；其中 R^{18} 是烷基；Z 代表 CR^5、O 或 S；R^1 选自 O、S 或与 R^5 一起形成含有碳原子或者 1 或 2 个选自 O、S 或 N 的杂原子的稠合 5 元或 6 元芳香环或杂芳环系统，例如苯基、萘基、呋喃基、吡咯基、吡啶基等。

[0100] R^2、R^3 和 R^5 所代表的适合的基团选自氢、卤素（例如氟、氯、溴、或碘）、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、取代或未取代的选自直链或支链的（C_1-C_4）烷基（例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等）的基团、选自被 1 个、2 个、3 个或 4 个卤素原子取代的烷基的卤代烷基（例如氯代甲基、氯代乙基、三氟甲基、三氟乙基、二氯甲基、二氯乙基等）以及（C_1-C_4）烷氧基基团（例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基等）。

[0101] R 代表 U 或 V，其中 U 选自氢、卤素（例如氟、氯、溴、或碘）、羟基、硝基、氰基、甲酰基、氨基、$-COR^{10}$、取代或未取代的选自直链或支链的（C_1-C_6）烷基（例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等）的基团、（C_1-C_6）烷氧基（例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基等）；R^{10} 代表 $-OR^{11}$ 或 $-NR^{12}R^{13}$；其中 R^{11} 代表氢、取代或未取代的选自以下的基团：（C_1-C_6）烷基例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等；（C_2-C_{20}）烯基例如乙烯基、丙烯基、丁烯基等；芳基，包括 5 元到 14 元的单环、双环或三环系统例如苯基、萘基等；芳烷基，例如苯甲基、苯乙基、苯丙基等；杂芳基，包括 5 元到 14 元的单环、双环或三环系统，例如吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、异噁唑基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、四唑基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、喹啉基、二氢喹啉基、四氢喹啉基、异喹啉基、二氢异

喹啉基、四氢异喹啉基等；以及反离子例如钠离子、钾离子或镁离子。

[0102] R^{12} 和 R^{13} 可相同或不同，并可独立地代表氢、取代或未取代的选自以下的基团：直链或支链的（C_1-C_4）烷基例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等；（C_2-C_{20}）烯基例如乙烯基、丙烯基、丁烯基等；芳基例如苯基、萘基等；杂芳基例如吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、异噁唑基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、四唑基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、苯并吡喃基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并吡咯基、苯并噁二唑基、苯并噻二唑基、苯并间二氧杂环戊烯基、喹啉基等；或者 R^{12} 和 R^{13} 一起形成杂脂环或杂芳环，例如吗啉基、哌啶基、哌嗪基、吡咯烷基、氮杂环丁基、吡咯、吡唑、三唑和四唑等，其可以是被取代的；

[0103] V 代表  或其盐；R^7 代表 $-OR^{14}$ 或 $-NR^{15}R^{16}$；

[0104] R^{14} 所代表的适合的基团选自氢、取代或未取代的选自以下的基团：直链或支链的（C_1-C_4）烷基例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等；直链或支链的（C_2-C_4）烯基例如乙烯基、丙烯基、丁烯基等；芳基例如苯基、萘基等；芳烷基例如苯甲基、苯乙基、苯丙基等；杂芳基例如吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、异噁唑基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、四唑基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、苯并吡喃基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并吡咯基、苯并噁二唑基、苯并噻二唑基、苯并间二氧杂环戊烯基、喹啉基等；所述反离子选自碱金属例如 Li、Na 和 K；碱土金属例如 Ca 和 Mg；不同碱的盐例如铵盐或取代的铵盐、二乙醇胺、α－苯乙胺、苄胺、哌啶、吗啉、吡啶、羟乙基吡咯烷、羟乙基哌啶、胆碱铝、氨基丁三醇等。

[0105] R^8 和 R^9 所代表的适合的基团选自 H、COR^{15}、取代或未取代的选自以下的基团：直链或支链的（C_1-C_4）烷基例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等；直链或支链的（C_2-C_4）烯基例如乙烯基、丙烯基、丁烯基等；芳基例如苯基、萘基等；杂芳基例如吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、异噁唑基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、四唑基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基等。

[0106] R^{15} 和 R^{16} 所代表的适合的基团选自氢、取代或未取代的选自以下的基团：直链或支链的（C_1-C_4）烷基例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基等；直链或支链的（C_2-C_4）烯基例如乙烯基、丙烯基、丁烯基等；芳基例如苯基、萘基等；杂芳基例如吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、异噁唑基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、四唑基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、苯并吡喃基、苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并吡咯基、苯并噁二唑基、苯并噻二唑基、苯并间二氧杂环戊烯基、喹啉基等；烷氧基例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基等；芳烷氧基例如苯甲氧基、苯乙氧基、苯丙氧基等；以及芳氧基例如苯氧基、萘氧基等。

[0107] 当被取代时，所述取代基可包括但不限于一个或多个选自以下的取代基：卤素例如氟、氯、溴、或碘；羟基、硝基、氰基、叠氮基、亚硝基、氨基、肼基、酰肼基、氧肟酸基（hydroxamate）、甲酰基、烷基、卤代烷基、卤代烷氧基、环烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、酰基、酰氧基、酰基氧基酰基（acyloxyacyl）、杂环基、杂芳基、单烷基氨基、二烷基氨基、酰基氨基、烷基氨基羰基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、杂环基羰基、芳基磺酰基、烷基亚磺酰基、芳基

亚磺酰基、烷基硫基、芳基硫基、氨磺酰基、烷氧基烷基以及羧酸及其衍生物例如羧酰胺和羧基氨基烷基。

[0108] p 和 q 是选自 1-3 的整数。

[0109] 本文提供了用于治疗肝病、肺病、糖尿病并发症、心血管及相关疾病的式(I)的化合物,所述治疗包括给予式(I)的化合物。

[0110] 本发明提供了用于治疗 NAFLD/NASH 和 NAFLD/NASH- 相关的疾病和病况的式(I)的化合物,所述治疗包括给予治疗有效量的式(I)的化合物。

[0111] 本发明还提供了用于治疗 NAFLD/NASH 的式(I)的化合物,所述治疗包括给予治疗有效量的式(I)的化合物。

[0112] 本发明还提供了用于治疗 NAFLD/NASH 的式(I)的化合物,所述治疗包括给予治疗有效量的式(A)的化合物。

[0113] 急性和慢性乙醇消耗后,肝脏脂肪酸甘油三酯和磷脂的合成加速。脂肪生成的增加是对脂肪生成酶包括脂肪酸合成酶、脂酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、ATP 柠檬酸裂解酶(ACL)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶和苹果酸酶的更高表达,并以此增加脂肪积累的反映。所述酶是由受转录因子甾醇调节因子结合蛋白 -1 (SREBP-1)调节的基因编码的。具有醇诱导的脂肪变性的个体易发展为酒精性脂肪性肝炎(ASH)(World J Gastroenterol2007,13,4974-4978)。

[0114] 本发明还描述了用于治疗肝纤维化、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、肝硬化、肝细胞癌、肺病、肺纤维化和银屑病的式(I)的化合物。

[0115] NAFLD 与经典的心血管危险因子、多囊性卵巢综合征(PCOS)、及梗阻性睡眠呼吸暂停(OSA)密切相关(Journal of Hepatology,2008,48,S104-S112)。

[0116] 本发明还描述了用于治疗与 NAFLD/NASH 相关疾病例如多囊性卵巢综合征、梗阻性呼吸暂停、及硬皮病银屑病的式(I)的化合物。

[0117] 本发明还描述了用于治疗肺病基相关疾病例如肺纤维化和肺转移的式(I)的化合物。

[0118] 本发明还描述了用于治疗银屑病的式(I)的化合物。

[0119] 本发明还描述了用于抑制 TNF-α、IL-6、iNOS、醛糖还原酶、和基质金属蛋白酶 -2 的式(I)的化合物。

[0120] 本发明还描述了用于降低血浆或肝脏中甘油三酯水平和血浆中葡萄糖水平的式(I)的化合物。

[0121] 术语“类似物”包括其中一个或多个 C、N、O 或 S 原子不同于母体结构的化合物。因此,母体结构中的 N 原子之一被 S 原子置换产生的化合物是母体化合物的类似物。

[0122] 术语“立体异构体”包括相互之间在原子的空间排列上不同但是其化学式和结构相同的异构体。立体异构体包括对映异构体和非对映异构体。

[0123] 术语“互变异构体”包括处于平衡中的易相互转化的异构体形式的化合物。例如,酮 - 烯醇互变异构体。

[0124] 术语“多晶型物”包括具有不同的结晶形式但具有相同的化学结构的化合物。

[0125] 术语“可药用溶剂合物”包括溶剂分子与溶质化合物的分子或离子的结合物。

[0126] 术语“衍生物”是指由式(I)的化合物、类似物、互变异构体、立体异构体、多晶型

物、水合物及其可药用盐或可药用溶剂合物通过简单的化学过程例如氧化、加氢、烷基化、酯化、卤化等转变一个或多个官能基团而产生的化合物。

[0127] 本发明中的可药用盐包括碱金属例如 Li、Na、K 等的盐；碱土金属例如 Ca、Mg 等的盐；有机碱例如二乙醇胺、α－苯乙胺、苄胺、哌啶、吗啉、吡啶、羟乙基吡咯烷、羟乙基哌啶、胆碱等的盐；铵盐或取代的铵盐；铝盐等。所述盐还包括氨基酸盐例如甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、胍等。所述盐还包括酸加成盐，其中适合的盐包括硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、高氯酸盐、硼酸盐、氢卤化物、乙酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、palmoates、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、苯甲酸盐、水杨酸盐、羟萘酸盐、苯磺酸盐、三氟乙酸盐、抗坏血酸盐、甘油磷酸盐、酮戊二酸盐等。可药用溶剂合物可以是水合物或含有结晶化的其他溶剂(例如醇)。

[0128] 一旦描述了某个术语，在整个专利中都适用相同的含义。本发明尤其优选的化合物包括：

[0129] 1.（2S）-2-氨基-3-(4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基）甲基］苯氧基}苯基）丙酸甲酯或其盐；

[0130] 2.(2S)-2-氨基-3-(4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基）甲基］苯氧基}苯基）丙酸或其盐，以及

[0131] 3.(4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基）甲基］苯氧基}苯基）乙酸或其盐。

[0132] 所述可药用盐是通过使式(I)的化合物与 1 到 10 当量的碱例如氢氧化钠、甲氧基钠、氢化钠、叔丁醇钾、氢氧化钙、氢氧化镁等，在溶剂例如醚、四氢呋喃、甲醇、叔丁醇、二氧杂环乙烷、异丙醇、乙醇等中反应而制备的。也可使用溶剂的混合物。有机碱例如二乙醇胺、α－苯乙胺、苄胺、哌啶、吗啉、吡啶、羟乙基吡咯烷、羟乙基哌啶、胆碱、胍、铵、取代的铵盐和铝盐，与氨基酸例如甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、精氨酸、苯丙氨酸等也可用于制备氨基酸盐。可选择地，可通过在溶剂例如乙酸乙酯、醚、醇、丙酮、四氢呋喃、二氧杂环己烷等中，用酸例如盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、乙酸、柠檬酸、马来酸、水杨酸、羟萘甲酸、抗坏血酸、软脂酸、琥珀酸、苯甲酸、苯磺酸、酒石酸、己二酸等处理来制备任意适合的酸加成盐。也可使用溶剂的混合物。

[0133] 需要指出的是，本发明的化合物可含有可以以互变异构形式存在的基团，并且虽然本文中只命名、描述、展示和／或要求保护其中的一种形式，但是所有形式均意图固有地纳入所述命名、描述、展示和／或权利要求中。

[0134] 构成本发明一部分的所述化合物的立体异构体可通过使用单一对映异构形式的试剂在任意可能的过程中制备，或者在单一对映异构形式的试剂或催化剂存在时进行所述反应制备，或者通过常规方法溶解立体异构体混合物制备。优选方法中的一些包括使用微生物拆分，或者通过任意适合的方法或通过使用手性碱（例如马钱子碱、金鸡纳生物碱、及其衍生物等）来拆分与手性酸（例如苦杏仁酸、樟脑磺酸、酒石酸、乳酸等）形成的非对映体盐。

[0135] 本发明还包括式(I)的化合物的前药。前药是其被给予至患者后可通过体内生理作用例如水解、代谢等而被化学修饰成为本发明的化合物的有活性或无活性的化合物。制造、使用前药的适合性和技术是本领域技术人员公知的。

[0136] 构成本发明一部分的通式(I)的化合物的多种多晶型物可通过所述式(I)的化合

物在不同条件下的结晶来制备。例如，使用不同的常用溶剂或其混合物进程再结晶；在不同温度下结晶；结晶过程中多种模式的制冷(从非常快速的制冷到非常慢速的制冷)。通过加热或熔解所述化合物然后逐渐制冷或迅速制冷，也可获得多晶型物。可通过固态探针 NMR 波谱法、IR 光谱法、拉曼光谱法、差示扫描量热法和粉末 X- 射线衍射或其他技术确定多晶型物是否存在。

[0137] 构成本发明一部分的式(I)的化合物的可药用溶剂合物可通过常规方法例如将式(I)的化合物溶解于溶剂例如水、甲醇、乙醇、溶剂混合物例如丙酮 / 水、二氧杂环己烷 / 水、N,N- 二甲基甲酰胺 / 水等(优选为水)中并使用差异结晶技术制备。

[0138] 本发明还提供了药用组合物，其含有一种或多种上述通式(I)的化合物、其衍生物、类似物、互变异构体、立体异构体、多晶型物、水合物、代谢产物、可药用盐、与常用药物载体、稀释剂等形成的可药用溶剂合物，所述药用组合物可用于治疗和 / 或预防肝病例如 NASH/NAFLD、肝纤维化、肝硬化、脂肪性肝炎等和相关疾病例如心血管疾病、多囊性卵巢综合征、梗阻性呼吸暂停等；银屑病；肺病例如肺转移等；以及糖尿病并发症例如糖尿病性视网膜病变、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病变、糖尿病性白内障等。

[0139] 所述药用组合物可以是通常使用的形式例如片剂、胶囊、粉剂、糖浆剂、溶液、悬液等，其可在适合的固态或液态载体或稀释剂、或者在适合的无菌介质中含有食用香料、增甜剂等以形成可注射溶液或悬液。可通过本领域公知的方法制备所述组合物。所述组合物中活性成分的量可小于 70 重量 %。这种组合物通常含有 1 重量 % 到 25 重量 %(优选 1-15 重量 %)的活性化合物，所述组合物中的其余部分为可药用载体、稀释剂、辅料或溶剂。适合的可药用载体包括固态填充剂或稀释剂以及无菌的水性溶液或有机溶液。

[0140] 一般来说，在治疗以缓解所述病况或疾病的症状或征候的过程中，用于治疗患者中具体病况的有效剂量可很容易地由医师确定和调整。一般来说，为获得有效的结果，给予约 0.01mg/kg 体重到 1000mg/kg 体重的日剂量是适合的。所述日剂量可以以单剂给予或分为多剂给予。在一些情况下，依据个体的反应，从上述日剂量上调或下调可能是必需的。典型的药物制品通常每剂量含有约 0.2-500mg 的式 I 的活性化合物和 / 或其具有药物活性的盐或溶剂合物。

[0141] 虽然本发明的化合物可以作为单独的活性药剂给予，但是其也可结合一种或多种本发明的化合物或者其他治疗试剂使用。当结合给予时，可将所述治疗剂制成同时给予或在不同时间给予的分离的组合物，或者所述治疗剂可作为一种组合物给予。

[0142] 术语“治疗有效量”或“有效量”是指当单独给予或与其他治疗剂结合给予需要这种治疗的哺乳动物时，足以进行如下所述有效治疗的式(I)的化合物或式(I)的化合物的混合物的量。

[0143] 本文中术语“动物”意图包括所有哺乳动物，尤其是人。本文中所述动物还指需要治疗的受试者或患者。依据被治疗的受试者和疾病病况、受试者的体重和年龄、所述疾病病况的严重程度、所选择的具体的式(I)的化合物、所选择遵循的给药方案、给予时间、给予方式等，所述治疗有效量有所不同，本领域技术人员可容易地确定所有所述条件。

[0144] 本文中术语“肝炎”是指肝脏的炎症。本文中术语“肝脏脂肪变性”是指肝细胞中脂肪微滴或甘油三酯的积累。本文中术语“肝细胞空泡形成”涉及含有多种大小的空泡的肝细胞。

[0145] 本文中术语“肝细胞气球样变”是指与特别是在脂肪性肝炎中发现的细胞膨胀和增大相关的特殊形式的肝细胞变性。

[0146] 术语“糖尿病并发症”包括但不限于大血管并发症和微血管并发症，并涉及糖尿病(高血糖症)诱发的疾病。

[0147] 术语“心血管疾病”是指心脏和循环系统的疾病。

[0148] 术语“预防”或“防止”是指阻止所述疾病，即使所述疾病的临床症状不发生。

[0149] 术语“治疗”/“处理”是指对哺乳动物中疾病的任何治疗，其包括：(a)抑制疾病，及减缓或中止临床症状的形成；和/或(b)减轻所述疾病，即使所述临床症状减退。

[0150] 本文中术语“用于----的化合物”涵盖下述的任意一种或多种：(1)化合物的用途，(2)化合物的使用方法，(3)在治疗中的用途，(4)制备用于治疗/处理的药物组合物/药剂的用途，或者(5)包括给予需要的受试者治疗有效量的所述活性化合物的治疗/处理/预防/减缓/抑制的方法。

[0151] 根据上述描述，本领域技术人员可容易地确定本发明的基本特征，并且在不偏离本发明的精神和范围的条件下，可对本发明进行多种改变和修改以使其适合多种用途和条件。

[0152] 通过下述实施例描述本发明，所提供的实施例仅用于说明目的，不应被解释为限制本发明的范围。对本领域技术人员而言显而易见的变化和改变意在纳入本发明的范围和性质内。

[0153] 表1提供了落入本发明范围内的化合物。

[0154] 表1

[0155]

式(A)的化合物 (2*S*)-2-氨基-3-(4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基)甲基]苯氧基}苯基)丙酸甲酯的氢氯酸盐	式(B)的化合物 (2*S*)-2-氨基-3-(4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基)甲基]苯氧基}苯基)丙酸的氢氯酸盐
式(C)的化合物 (4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基)甲基]苯氧基}苯基)乙酸	式(C)的化合物二钠盐 (4-{4-[(2,4-二氧-1,3-噻唑烷-5-基)甲基]苯氧基}苯基)乙酸的二钠盐

[0156] 可通过US6794401B2、US7521465B2和US7781464B2中所述的方法制备式(I)和式(A)-(C)的化合物或其盐。

[0157] 生物学测试

[0158] 1.NAFLD/NASH

[0159] 为研究式(A)、(B)、(C)的化合物及其盐对NAFLD/NASH的关键特征的作用，使用超

营养饮食、博来霉素和脂多糖(LPS)建立相关的动物模型。

[0160] 实施例 -1: 式(A)的化合物对 DIO/NAFLD 小鼠体重的作用

[0161] 通过饲喂能够刺激人肥胖症和 NAFLD 的多种特征的超营养饮食来建立啮齿动物肥胖症和 NAFLD 模型。按如下方式处理这些特征。使用 6-8 周龄、体重 16-22g 的 30 只 C57BL/6 雄性小鼠进行该研究。将动物分为 2 组。第一组(n=8,其中 n 是指动物数量)用饲料(chow feed)(Nutri Lab® Rodent,Tetragon Chemie Pvt.Ltd.,Bangalore)饲喂作为正常对照,第二组(n=20)用 60Kcal% 高脂肪饮食(HFD)(研究用的饮食,New Brunswick,NJ,Cat#D12492 具有蓝色染料)饲喂,持续 90 天。动物基于其体重进行选择。用正常饮食饲喂的动物(n=8)作为正常对照(第 I 组),用 HFD 饲喂的动物分为两组 :DIO/NAFLD 对照(第 II 组)(n=10)和用 100mg/kg 式(A)的化合物处理的第 III 组(n=9),持续 28 天。该过程中,每日记录动物体重和饮食摄入。

[0162] 实施例 -2: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠的作用

[0163] 通过饲喂能够刺激 NAFLD/NASH 的多种特征的超营养饮食建立啮齿动物 NAFLD/NASH 模型。对这些特征进行如下处理。使用 6-8 周龄、体重 16-36g 的 50 只 C57BL/6 雄性小鼠进行该研究。将动物分为 2 组。第一组(n=10)用饲料(Nutri Lab® Rodent,Tetragon Chemie Pvt.Ltd.,Bangalore)饲喂作为正常对照,第二组(n=40)用 60Kcal%HFD (研究用的饮食,New Brunswick,NJ,Cat#D12492 具有蓝色染料)和 40% 高果糖液(HFL)饲喂,持续 60 天。45 天后,处死来自疾病诱导和正常对照组中的两只动物,进行肝组织病理学检测以确认 NAFLD/NASH 的诱导。用正常饮食饲喂的动物作为正常对照(第 I 组),用 HFD 和 HFL 饲喂的动物分为 3 组(n=6-8):NAFLD/NASH 对照(第 II 组)、分别经口服给予 100mg/kg 式(A)的化合物和 350mg/kg 二甲双胍(持续 28 天)的第 III 组和第 IV 组。第 28 天,将动物禁食 12 小时,第 29 天取血、分离血浆用于生物化学和化合物浓度分析。然后将所述动物处死。取其肝脏并称重。将肝组织用于化合物浓度分析、甘油三酯评估和组织病理学检测。并观测肉眼可见的肝脏病理状况。

[0164] 实施例 -3: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠的作用

[0165] 依据实施例 -2 中的方案。将式(A)的化合物与其他抗糖尿病化合物进行比较(图 -8-13)。

[0166] 实施例 -4: 式(A)的化合物对高胆固醇 - 高脂肪(HC-HF)饮食饲喂的仓鼠的作用

[0167] 通过饲喂能够刺激人血脂障碍特征的含有果糖液(10%)的超营养饮食建立仓鼠血脂障碍。对这些特征进行如下处理。使用 14-16 周龄、体重 100-160g 的 30 只雄性金仓鼠(Golden Syrian hamster)进行该研究。将动物分为 2 组。第一组(n=7)用饲料(Nutri Lab® Rodent,Tetragon Chemie Pvt.Ltd.,Bangalore)饲喂作为正常对照,第二组(n=23)用 HC-HF 饮食(自制(in-house made))饲喂,所述组合物中含有玉米油 11.50%、椰子油 11.50%、胆固醇 0.50%、胆酸钠 0.25% 以及 Nutri Lab®饲料 76.25%,并且为所述动物的饮用水中提供 10% 果糖。14 天后,从所述动物中取血用于评估生物化学参数即甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和葡萄糖以确定疾病的诱导。基于所述生物化学参数对动物分组。用正常饮食饲喂的动物(n=7)作为对照组(第 I 组),用含果糖液(10%)的超营养饮食饲喂的动物分为 3 组 :疾病对照(第 II 组)(n=7)、分别经口服给予 30mg/kg 和 100mg/kg 式(A)的化合物(持续 28 天)的第 III 组(n=8)和第 IV 组(n=8)。该过程中,每日记录动物体重。处

理第 16 天和第 28 天将所述动物禁食 4 小时并取血，分离血浆和血清用于生物化学分析即 TG、TC、血浆葡萄糖和非酯化脂肪酸(NEFA)。

[0168] 实施例 -5：式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中 NAFLD/NASH 的剂量反应

[0169] 按照与实施例 -2 所述相同的方案建立 NAFLD/NASH 模型。诱导周期结束时，将动物进行如下分组：将正常饲料饲喂的动物(n=9)作为正常对照(第 1 组)，将用 HFD 和 HFL 饲喂的动物分为 4 组(n=9-12)：NAFLD/NASH 对照(第 II 组)，第 III 组、第 IV 组和第 V 组分别经口服给予 10mg/kg、30mg/kg 和 100mg/kg 式(A)的化合物(持续 28 天)。处理 28 天后，将动物禁食 12 小时并取血用于生物化学评估。取血后，将动物处死，取其肝脏并称重。将肝组织用于化合物浓度分析、TG 评估和组织病理学检测。并观测肉眼可见的肝脏病理状况。

[0170] 实施例 -6：式(A)的化合物对饮食诱导的肥胖(C57BL/6)小鼠中胰岛素耐量试验(ITT)的影响

[0171] 通过饲喂可刺激人肥胖症和胰岛素抗性的多种特征的 60Kcal% 高脂肪饮食建立具有肥胖症和胰岛素抗性的动物模型。对这些特征进行如下处理。使用 6-8 周龄、体重 16-22g 的 30 只 C57BL/6 雄性小鼠进行该研究。将动物分为 2 组。第一组(n=10)用饲料(Nutri **Lab®** Rodent, Tetragon Chemie Pvt. Ltd., Bangalore)饲喂作为正常对照，第二组(n=25)用 60Kcal% 高脂肪饮食(HFD)(研究用的饮食，New Brunswick, NJ, Cat#D12492 具有蓝色染料)饲喂，持续 120 天。诱导周期结束后基于胰岛素抗性选择动物，用于后续研究。用正常饮食饲喂的动物作为正常对照(第 I 组)，用 HFD 饲喂的动物分为 2 组(n=6-7)：DIO 对照(第 II 组)、用 30mg/kg 式(A)的化合物处理(持续 28 天)的第 III 组。在此过程中，每日记录体重和饲料摄入。第 28 天，将动物禁食 12 小时并进行 ITT。间隔 3 天后，再次将动物禁食 12 小时、取血并分离血浆和血清用于生物化学分析。

[0172] 实施例 -7：式(A)的化合物对新链脲佐菌素(nSTZ)处理的小鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 的剂量反应

[0173] 通过对 nSTZ 处理的大鼠饲喂超营养饮食建立啮齿动物 NAFLD/NASH 模型。该模型刺激人 NAFLD/NASH 的多种特征。将 1 天大的 Wistar 大鼠幼仔注射(腹腔内)100mg/kg 链脲佐菌素或生理盐水以诱发胰岛素抗性。处理 21 天后，将 STZ 处理的动物分为 2 组并用常规饲料或者 60Kcal% 高脂肪饮食和含 40% 果糖的饮用水饲喂 3 个月以诱导 NAFLD/NASH。盐水处理的动物用常规饲料饲喂。诱导 45 天和 60 天后，从所述诱导组中取 1 只动物处死，进行肝组织病理学检测以确定 NAFLD/NASH 的诱导。诱导 90 天后，将动物分为下述组：用常规饲料饲喂的动物作为正常对照(第 I 组，n=9)和 nSTZ 对照(第 II 组，n=7)。将所述疾病诱导组分为 4 组：NAFLD/NASH 对照(第 III 组，n=9)，分别经口服给予 1mg/kg 体重、3mg/kg 体重和 10mg/kg 体重的式(A)的化合物处理 48 天的第 IV 组(n=7)、第 V 组(n=8)和第 VI 组(n=9)。整个实验过程中，每日记录体重、食物摄入和水摄入。第 31 天和第 48 天将动物禁食 12 小时，第 32 天和 49 天取血并分离血浆用于生物化学和化合物浓度分析。第 49 天，取血后将动物处死。采集肝脏和脂肪垫并称重。将肝组织用于化合物浓度分析、TG 评估以及组织化学检测和表达分析。还观察测肉眼可见的肝脏病理状况。

[0174] 实施例 -8：式(A)的化合物对 C57BL/6 小鼠中博来霉素诱导的肺纤维化的作用(预防性)

[0175] 该研究使用雌性 C57BL/6 小鼠。基于其体重将动物分为 4 组。为诱导纤维化，将

博来霉素以 0.1U/ 动物(体积为 50uL)经气管内给予第 II 组(疾病对照)、第 III 组和第 IV 组,第 I 组(正常对照)只给予生理盐水。在博来霉素给药之前的 7 天时间和之后的 14 天时间内,将博来霉素激发的第 III 组和第 IV 组动物分别用己酮可可碱(20mg/kg 经口服给予)和式(A)的化合物(100mg/kg 经口服给予)处理,而第 I 组动物和博来霉素激发的第 II 组动物接受赋形剂(vehicle)。记录体重、饲料和流体摄入,以及死亡率。研究结束时,从动物取血并将血浆储存于超低温冰箱(-80℃)中用于生物化学参数评估。然后,将动物处死,收集肺组织并称重。将右肺组织储存于超低温冰箱(-80℃)中用于表达研究和药物浓度分析。通过缓慢浸制将左肺在福尔马林(10%)中固定,然后将其浸入并保存在福尔马林(10%)中用于组织病理学评估。

[0176] 实施例 -9: 式(A)的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中脂多糖(LPS)诱导的 TNF-α 水平的影响

[0177] 根据与实施例 -2 中所述相同的方案建立 NAFLD/NASH 模型。诱导后,将动物如下分组。用正常饮食饲喂的动物(n=10)作为正常对照(第 I 组),用 HFD 和 HFL 饲喂的动物分为 2 组 :疾病对照(第 II 组) (n=10)和处理组(第 III 组) (n=9)。处理持续时间为 28 天。在此期间,第 I 组和第 II 组动物接受水作为赋形剂,第 III 组动物用经口服给予的 100mg/kg 式(A)的化合物处理。第 27 天,将动物禁食 12 小时 ;第 28 天,处理 60 分钟后通过腹腔内途径用 LPS (500μg/ 动物)激发动物。LPS 激发 90 分钟后,进行血液收集、分离血浆和血清,并将其储存于 -80℃超低温冰箱中,用于后续分析。血液收集后,将动物处死,采集肝脏脂肪、腹股沟脂肪和附睾脂肪并称重。

[0178] 实施例 -10: 式(C)化合物的二钠盐在 HC-HF 饮食饲喂的仓鼠中的作用

[0179] 依据实施例 4 中所述的方案建立血脂障碍模型。14 天后,从动物中取血用于评估生物化学参数以确定疾病的诱导。诱导期后,将动物分组如下 :正常饲料饲喂的动物(n=6)作为正常对照(第 I 组)、含果糖液(10%)的超营养饮食饲喂的动物分为 3 组 :疾病对照(第 II 组) (n=7)、分别以经口服给予 10mg/kg 和 30mg/kg 式(C)化合物的二钠盐处理(持续 28 天)的第 III 组(n=7)和第 IV 组(n=7)。该过程中,每日记录动物体重。第 14 天和 28 天,将动物禁食 4 小时并取血,分离血浆和血清并用于生物化学分析。

[0180] 实施例 -11: 式(A)的化合物和式(C)化合物的二钠盐对小鼠中 NAFLD/NASH 的作用

[0181] 使用与实施例 -2 中所述相同的方案建立 NAFLD/NASH 模型。诱导期结束时,将动物分组如下 :正常饮食饲喂的动物(n=8)作为正常对照(第 I 组)、用 HFD 和 HFL 饲喂的动物进一步分为 3 组(n=9):NAFLD/NASH 对照(第 II 组)、第 III 组和第 IV 组分别经口服给予 100mg/kg 式(A)的化合物和 30mg/kg 式(C)化合物的二钠盐,持续 28 天。第 28 天,使动物禁食 12 小时并在第 29 天收集血液,分离血浆并用于生物化学和化合物浓度分析。血液收集后,将动物处死。采集其肝脏并称重。将肝组织用于组织病理学检测。并观测肉眼可见的肝脏病理病况。

[0182] 实施例 -12: 式(A)的化合物和式(C)化合物的二钠盐对小鼠中醇诱导的急性高甘油三酯血症的作用

[0183] 使用 6-8 周龄、体重 22-28g 的 C57BL/6 雄性小鼠进行该研究。将动物分为 4 组(n=8),并饲喂正常饲料(Nutri Lab® Rodent, Tetragon Chemie Pvt. Ltd., Bangalore)和

饮用水。第 I 组和第 II 组动物用作正常对照和赋形剂处理的疾病对照。第 III 组(n=8)和第 IV 组(n=8)动物分别用经口服给予 100mg/kg 式(A)的化合物和 30mg/kg 式(C)化合物的二钠盐处理 7 天。第 7 天,给予化合物 1 小时后,用经口服给予的 40% 醇(10ml/kg 体重)激发第 II 组、第 III 组和第 IV 组的动物。激发 18 小时后,从动物中取血,并分离血浆并用于生物化学参数分析。

[0184] 生物化学参数

[0185] 使用市售试剂盒测量所述参数例如葡萄糖、ALT、AST、TC、TG(临床化学分析仪 Erba XL300)、胰岛素(Linco ® - CA, 产品编号:EZRMI-13K)、和 TNFα (GE Healthcare, Amersham, UK. 产品编号:RPN2718)。用市售 NEFA C 试剂盒(产品编号:279-75401, Wako pure chemical industries ltd, Japan)测量血清中的 NEFA。

[0186] 肝脏甘油三酯:依据 Folch 等(Journal of Biological Chemistry, 1957, 497)和 Purushotham A 等(Journal of Lipid Research, 2007, 45, 444-452)所述的方法提取肝脏脂质。使用标准市售试剂盒评估 TG。

[0187] 肝脏组织病理学:

[0188] 将肝脏样本用 10% 福尔马林固定并包埋于石蜡中。切为 5μm 的切片并用苏木精和伊红(HE)染色。使用分析系统(NIKON, ECLIPSE-E200, Japan)检测肝脏组织学(Carson FL., 1996)。

[0189] 用式(A)的化合物处理的动物显示出体重减轻、空腹血糖降低和肝脏脂肪变性减轻。该化合物对这些特征的作用好于其他的标准化合物例如二甲双胍、维格列汀(Vildagliptin)和罗西格列酮。

[0190] 式(A)的化合物和式(C)化合物的二钠盐处理的疾病模型显示出对 NAFLD/NASH 关键特征的显著作用。特别地,与未处理的相关疾病对照相比,小鼠显示出体重(图 1、2、8、16 和 23)、葡萄糖(图 5 和 9)、AST (图 17)、ALT (图 10 和 18)、TNF-α (图 28)水平的下降,HOMA-IR 的改善(图 22)及肝脏组织病理学(肝脏脂肪变性)的改善(图 6、7、12、13、19、20、21、24、25、30、31 和 32)。用式(A)的化合物和式(C)化合物的二钠盐处理的血脂障碍仓鼠显示 TG 和 NEFA 显著减少(图 14、15 和 29)。在博来霉素诱导的纤维化中,式(A)化合物的处理显著防止了纤维化形成(图 26 和 27)。式(A)化合物和式(C)化合物的二钠盐处理的醇诱导的急性高甘油三酯血症小鼠显示 TG 显著减少(图 33)。该化合物对这些特征的作用好于其他的标准化合物例如二甲双胍、维格列汀和罗西格列酮。

[0191] 总之,除对其他关键特征例如肥胖症、胰岛素抗性、血脂障碍和纤维化的影响外,式(A)的化合物还显示出对 NAFLD/NASH 的主要标志——肝脏脂肪变性的显著作用。该化合物可成为 NAFLD/NASH 治疗的有效药物。

[0192] 数据分析:

[0193] 数值表示为平均值 ± 标准误差。使用 GraphPad Prism®(第 4 版)生成图表。使用 t- 检验或单因素方差分析及 Dunnett 事后检验或双因素方差分析及邦弗朗尼事后检验进行统计分析。当 $P<0.05$ 时认为结果是显著的。

[0194] 式(A)的化合物还对促炎性细胞因子例如 TNF-α 有显著作用,因此其可用于治疗如银屑病的疾病。

[0195] 实施例 -13: 式(A)、(B)和(C)的化合物对 3T3-L1 小鼠成纤维细胞中脂肪形成的

作用

[0196] 将 3T3-L1 成纤维细胞以 10,000 细胞 / 孔的浓度接种于 24 孔组织培养板中的总体积 1mL 的含 10% 胎牛血清的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM 培养基)中。在 CO_2 培养箱中 37℃孵育过夜后,用赋形剂(0.01%DMSO)、罗西格列酮(1μM、10μM)、不同浓度的式(A)的化合物(1μM、10μM)、式(B)的化合物(1μM、10μM)和式(C)的化合物(1μM、10μM)处理所述细胞以测试其脂肪形成的性质。每两天之后,用新鲜的培养基和药物替换所用的培养基成分。该过程实施 7 天。处理 7 天后,在 40℃用 10% 福尔马林将细胞固定 1 小时,用油红 O 溶液染色 10 分钟并用 1×PBS 冲洗 6 次以移除过量的染料。将所述板干燥并用 Nikon E200 显微镜 40× 物镜观察,用 Nikon DXM1200C 数码相机拍照。照片见图 34。

[0197] 用 1μM 或 10μM 罗西格列酮处理的细胞中观察到的红色素是油红 O 染色的细胞内脂质,其代表脂肪形成(图 34,1μM 和 10μM 罗西格列酮)。与罗西格列酮不同,1μM 或 10μM 式(A)、(B)和(C)的化合物在处理 7 天后未在 3T3-L1 成纤维细胞中诱导脂肪形成(图 34,式(A)、(B)和(C)的化合物与罗西格列酮比较)。因此,该数据显示式(A)、(B)和(C)的化合物未诱导 3T3-L1 成纤维细胞中的脂肪形成。

[0198] 实施例 -14: 式(B)和(C)的化合物对激活的肝脏星形细胞(HSC)中 1 型胶原分泌的作用

[0199] 用药物处理 HSC 细胞并孵育过夜。将条件培养基取出并用 TCA- 丙酮方法提取分泌的蛋白。收集所述细胞用于蛋白质印迹分析,并向样本中加入 1%SDS。使用 1:500 稀释的 1 型胶原的多克隆抗体(Abcam;AB292)和 1:1000 稀释的与辣根过氧化物歧化酶缀合的山羊抗兔 IgG (Bangalore GENEI)检测蛋白。使用底物 TMB/H_2O_2 使所述印迹显色。使用 β- 肌动蛋白看家基因的表达水平作为上样对照。

[0200] 式(B)和(C)的化合物处理后,激活的肝脏星形细胞中胶原分泌显著减少。

[0201] 本发明的化合物已被证明抑制激活的肝脏星形细胞中的 1 型胶原(图 35a 和 35b)。该作用与相同浓度的测试化合物已酮可可碱相当。因此,所述化合物具有抗纤维化性质,并可用于治疗肝纤维化和其他纤维化疾病,其中所述疾病的病理学涉及胶原基因表达的调变(例如 :肺纤维化、肾纤维化、心纤维化、硬皮病等)。

[0202] 实施例 -15: 肝脏星形细胞中细胞凋亡的诱导(LX2)

[0203] 碘化丙啶(PI)在不同的实验系统中广泛用于测量细胞凋亡(Eur. J.Pharmacol.,2003,473,117-125 ;Br.J.Pharmacol.,2009,158,1720-1734)。用赋形剂(DMSO)、十字孢碱(0.1nM)、式(B)的化合物(2μM)、式(C)的化合物(2μM)处理 LX2 细胞 8 小时,然后用碘化丙啶(PI)处理 10 分钟。然后,用 PBS 将细胞冲洗 2 次以移除未结合的 PI,并用连接到奥林巴斯 IX71 显微镜的 DP71 相机获取荧光照片。通过碘化丙啶(PI)染色检测凋亡细胞,并评估每视野的凋亡细胞百分数。从照片中计数每视野中 PI 阳性细胞数和总细胞数并将其标绘为凋亡细胞百分数。

[0204] 与未处理的对照和赋形剂对照相比,所述化合物可显著诱导 LX2 细胞凋亡。数据示出了 * 与赋形剂(DMSO)相比,在化合物(B)和化合物(C)处理下 HSC 的凋亡增加($P<0.01$)。2μM 化合物(B)处理时,观察到 6±0.40% 的细胞凋亡。而化合物(C)处理时,7.5±0.64% 的 LX2 细胞凋亡。这些值显著高于赋形剂(DMSO)处理的细胞中诱导的凋亡。该实验中,已知的有效细胞凋亡诱导剂十字孢碱(stau)显示出 LX2 细胞的约 23% 的凋亡。

因此，该研究的数据显示式(B)的化合物和式(C)的化合物在HSC中诱导细胞凋亡。结果见图36。

[0205] 实施例-16：肝脏星形细胞(LX2)中细胞凋亡的选择性诱导

[0206] 采用与上述实施例-7中相同的方法。结果见图37。

[0207] 通过碘化丙啶(PI)染色检测凋亡细胞，并估计每视野中凋亡细胞的百分数。数据显示，在化合物(B)和化合物(C)处理下肝脏星形细胞(LX2)凋亡增加。但是，*与赋形剂(DMSO)相比，在式(B)的化合物和式(C)的化合物处理下，人内皮细胞(ECV304)、从皮肤活组织检测中分离的人成纤维细胞或者人肝细胞(HepG2)未观测到显著的凋亡($P<0.01$)。

[0208] 与未处理对照或赋形剂对照相比，所述化合物显示出肝脏星形细胞的细胞凋亡的显著诱导。但是，与赋形剂对照(DMSO)相比，式(B)或式(C)的化合物处理的肝细胞、从皮肤活组织检测中分离的人成纤维细胞、内皮细胞未显示出显著的细胞凋亡。因此，该研究的数据显示式(B)和式(C)的化合物对细胞凋亡的影响是HSC选择性的。

[0209] 选择性诱导肝脏中星形细胞的凋亡可促进或增强肝病尤其是肝纤维化的消除。因此，所述化合物提供了通过选择性诱导肝脏中星形细胞的凋亡来治疗肝病的方法。

[0210] 2. 糖尿病并发症

[0211] 醛糖还原酶：使用大鼠晶体醛糖还原酶。预先将测试化合物和/或赋形剂与3000μg/ml酶(J Enzyme Inhib.1993,7,249-256；Biol.Pharm.Bull.1994,17,458-459)和0.2mM NADPH在pH6.2的磷酸缓冲液中于25℃孵育15分钟。通过加入10mM DL-甘油醛起始反应并继续孵育20分钟。通过分光光度计测量剩余的NADPH量。在10μM下筛选化合物。由于不同批次之间酶活性可能变化，所以如果需要可调节所用的浓度。标准参照化合物是槲皮素(Quercitin)，每次实验中在多个浓度下对其测试以获得竞争曲线，可由其计算IC_{50}(表2)。

[0212] 表2：醛糖还原酶抑制活性

[0213]

编号	化合物式	IC_{50}(μM)
1	A	4.07
2	B	4.92
3	C	1.43
4	槲皮素	0.35

[0214] 基于体外研究所得的结果，可得出化合物A、B和C都是醛糖还原酶的适度有效抑制剂。IC_{50}值与索比尼尔(Sorbinil)(2μM)相当，表明抑制醛糖还原酶以及治疗糖尿病并发症的潜在体内活性，(Biochemical Pharmacology,1986,35,2955-2959)。

[0215] iNOS抑制：

[0216] 先用式(A)的化合物或罗西格列酮孵育1小时，然后用1μg/mL LPS激发6小时。测定结束时，用抗iNOS的抗体检测细胞溶解产物。

[0217] 式(A)的化合物可在这些细胞中抑制iNOS产生(图38)。基于该结果，可得出式

(A)的化合物是 iNOS 的强力抑制剂,其活性高于相同浓度(30μM)的罗西格列酮。由于糖尿病并发症的病理中涉及 iNOS,可以预期式(A)的化合物可在 iNOS 升高导致的新血管形成发生中具有保护作用。

[0218] 抑制 LPS 诱导的 TNF-α 和对 IL-6 的体内抑制:

[0219] 本研究在小鼠 10-11 周龄时进行。第 0 天,测量小鼠体重并将其分为 2 组(每组 6 只),以得到类似的平均组体重。每日上午 9:30 和 10:30 之间经口服给予所述小鼠赋形剂(去离子水,第 1 组)或式(A)的化合物(50mg/kg;第 2 组),共 10 天。在研究的第 3、7 和 10 天,在给予赋形剂或药物之前测量体重。第 10 天,通过腹腔内给予小鼠 400μg/kg 的 LPS。1 小时后经口服给予赋形剂或式(A)的化合物。再过 90 分钟后,通过二氧化碳窒息处死小鼠。通过心脏穿刺收集血液,并进行处理以获得血清。将所述血清储存在 -80℃下用于离体分析 TNF-α 和 IL-6 细胞因子。

[0220] 血清 TNF-α 免疫测定:

[0221] 使用 Quantikine 小鼠 TNF-α 免疫测定试剂盒对每组小鼠测定血清 TNF-α 浓度。依据制造商提供的说明书进行测定。将赋形剂处理组和式(A)的化合物处理组的小鼠的血清样本在校准稀释液中以 1:20 稀释。用酶标仪在 450nm 下检测每孔的吸光度(图 39)。

[0222] 血清 IL-6 免疫测定:

[0223] 使用 Quantikine 小鼠 IL-6 免疫测定试剂盒对每组小鼠测定血清 IL-6 浓度。依据制造商提供的说明书进行测定。将赋形剂处理组的小鼠血清样本在校准稀释液中以 1:200 稀释。将处理组的小鼠的血清样本在校准稀释液中以 1:100 稀释。用酶标仪在 450nm 下检测每孔的吸光度(图 40)。

[0224] 链脲佐菌素(STZ)诱导的 I 型糖尿病模型中豆状核变性的体内改善:

[0225] 通过向斯普拉格-道利鼠(Sprague Dawley rat)注射 STZ 并保持 10 周以诱发糖尿病并发症来建立动物模型。最初,动物出现血糖过多,并慢性地产生糖尿病和糖尿病并发症的多种特征,这些特征刺激人糖尿病及并发症。对这些特征进行如下处理。使用 6-8 周龄、体重 150-190g 的 40 只斯普拉格-道利鼠进行该研究。将动物分为 2 组。第一组(n=10)注射生理盐水作为正常对照,第二组(n=30)用 STZ (50mg/kg,静脉注射)(Sigma.USA)处理。每周记录体重,每月用血糖测量仪(Contour TS,Bayer Healthcare Ltd.)记录血糖。每周检测眼睛中的内障性变化。糖尿病诱导 10 周后,基于血液葡萄糖水平和白内障严重程度将动物分组。第 1 组作为正常对照(n=10)。具有白内障的糖尿病动物分为 2 组:第 2 组作为疾病对照(n=9),第 3 组(n=10)用 100mg/kg 剂量的式(A)的化合物处理 2 个月。试验的最后一天,使动物禁食 12 小时,第二天收集血液,分离血浆并用于生物化学分析。然后将所述动物处死,取双眼并用于组织病理学检查。

[0226] 经口服给予式(A)的化合物影响了糖尿病并发症的每一个关键特征。特别地,小鼠显示 TNF-α (图 39)和 IL-6 (图 40)减少。用式(A)的化合物处理的大鼠显示出豆状核变性的显著改善(图 41)。在体外,式(A)的化合物可显示出使醛糖还原酶活性和 iNOS 产生下降(图 38)。

[0227] 数据分析:

[0228] 数值表示为平均值 ± 标准误差。使用 GraphPad **Prism®**(第 3 版)生成图表。使用 GraphPad **Prism®**通过双尾非配对 t- 检验及 Welch's 校正,和双因素方差分析及邦弗

朗尼事后检验进行统计分析。当 P<0.05 时认为结果显著。

[0229] 3. 基质金属蛋白酶 -2（MMP-2）抑制活性（10μ M 时）

[0230] MMP-2 酶与肺转移有关，并且其抑制可用于预防或治疗肺转移（Journal of Ethnopharmacology2011，133，426-433）。本发明的化合物可抑制 MMP-2 活性，因此其可用于防止或治疗肺转移（表 3）。

[0231] 表 3：基质金属蛋白酶 -2 抑制活性

[0232]

编号	化合物式	抑制（%）
1	(B)	59
2	(C)	16

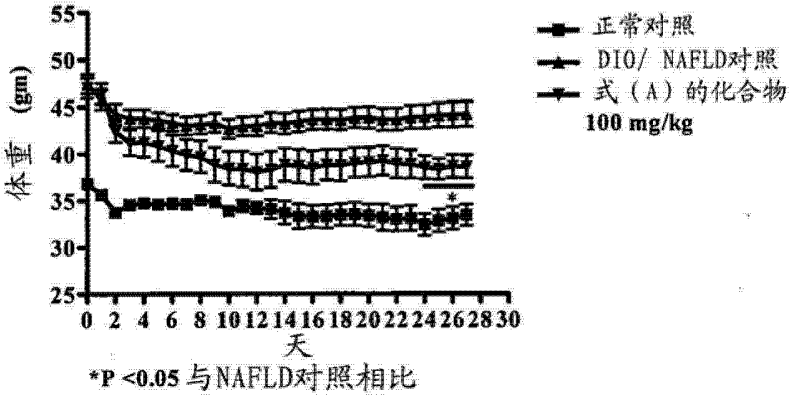


图 1

图 1：式 (A) 的化合物对 DIO/NAFLD 小鼠体重的作用

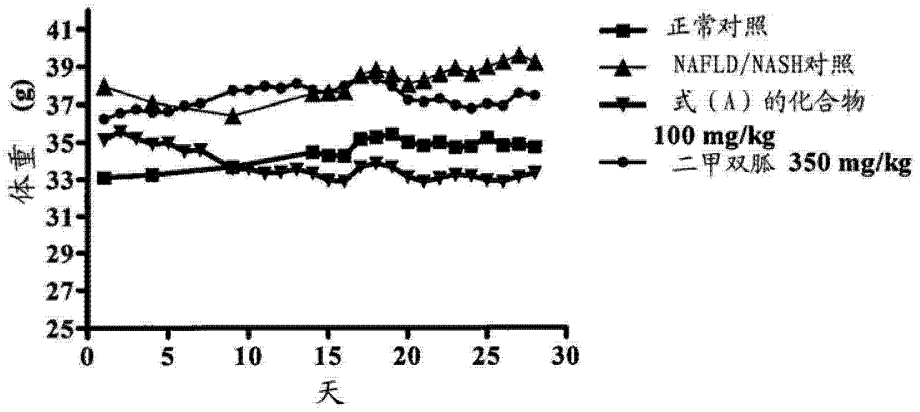


图 2

图 2：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠体重的作用

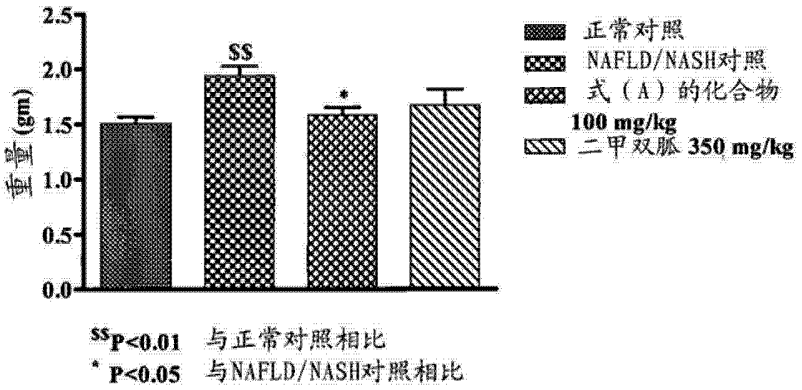


图 3

图 3：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠肝脏重量的作用

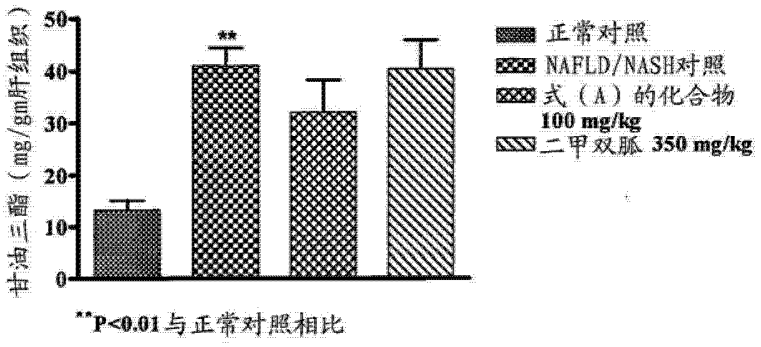


图 4

图 4：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝脏 TG 水平的作用

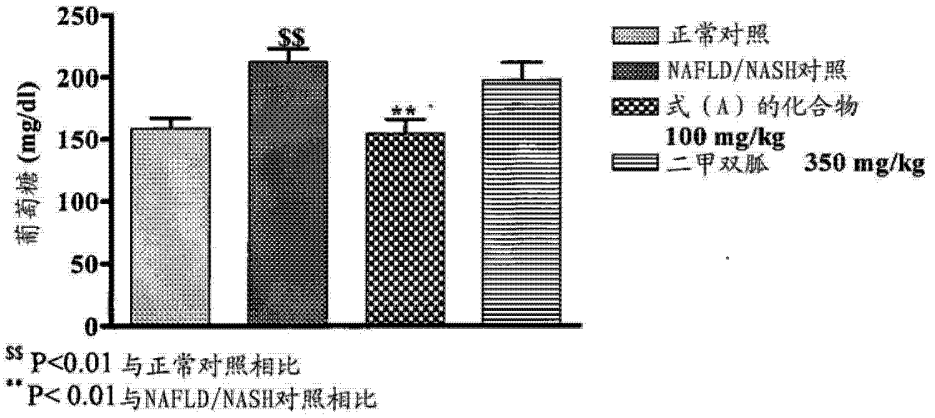


图 5

图 5：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中葡萄糖水平（禁食）的作用

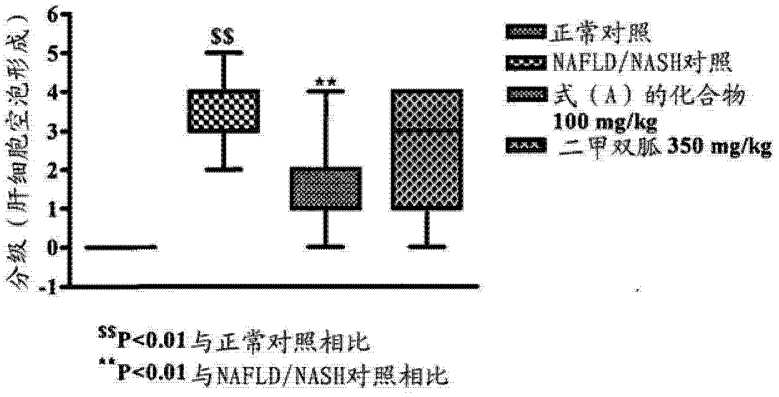


图 6

图 6：图示为式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝脏组织病理学的作用的评级

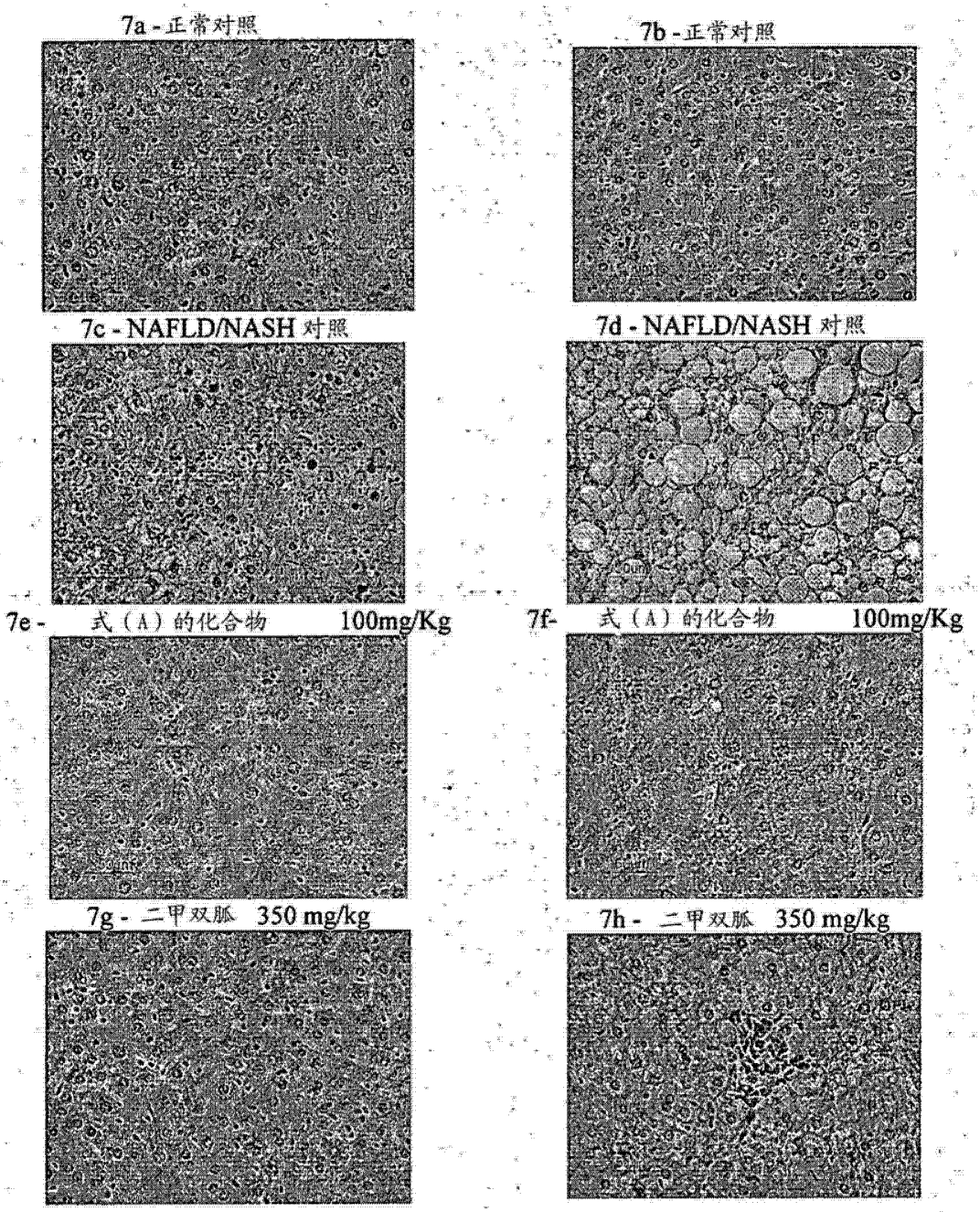


图 7

图 7(7a-7h)：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 模型中肝脏组织病理学变化的作用

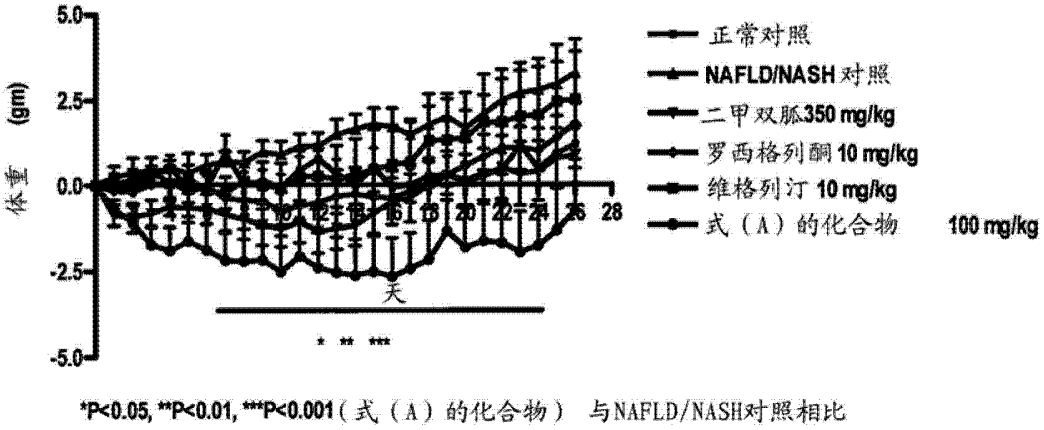


图 8

图 8 :式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠的体重增加的作用

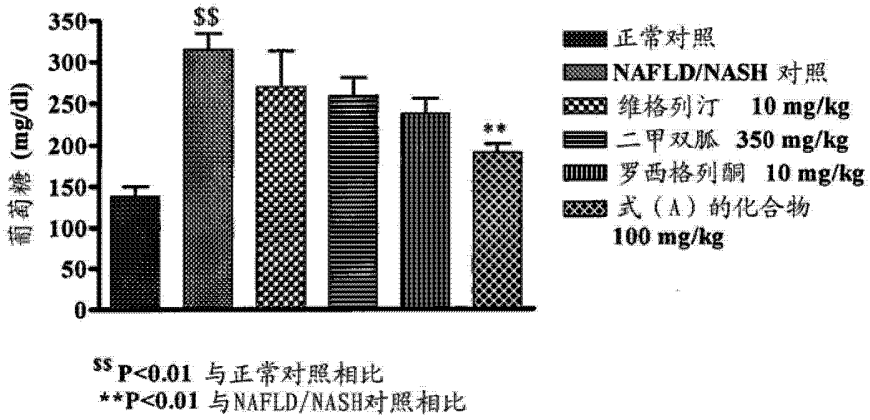


图 9

图 9 :式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中葡萄糖水平的作用

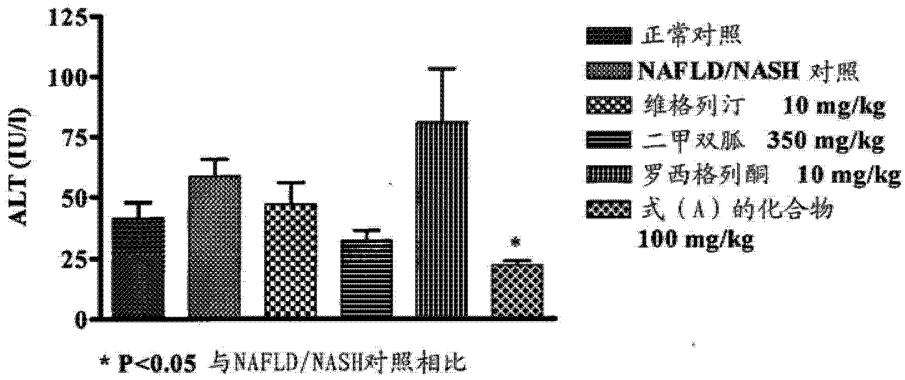


图 10

图 10 :式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中 ALT 水平的作用

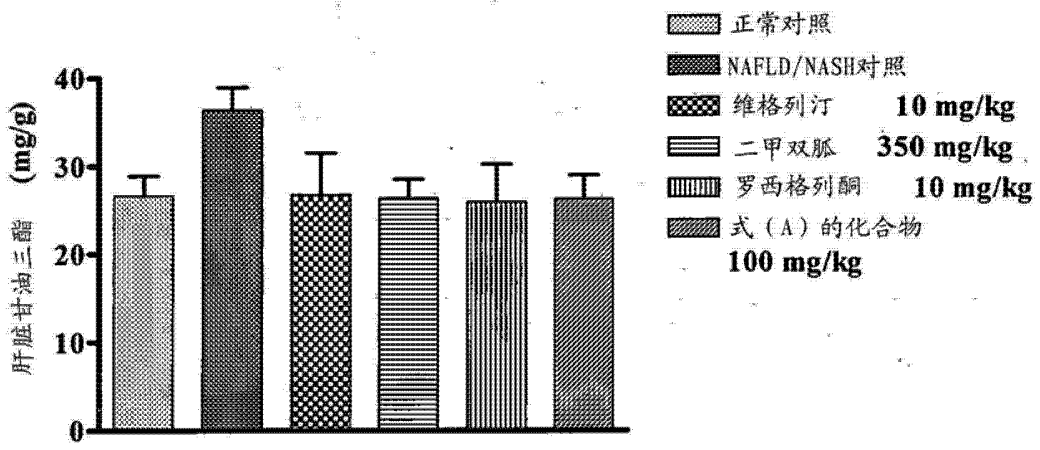


图 11

图 11：式 (A) 的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 中的肝脏甘油三酯的作用

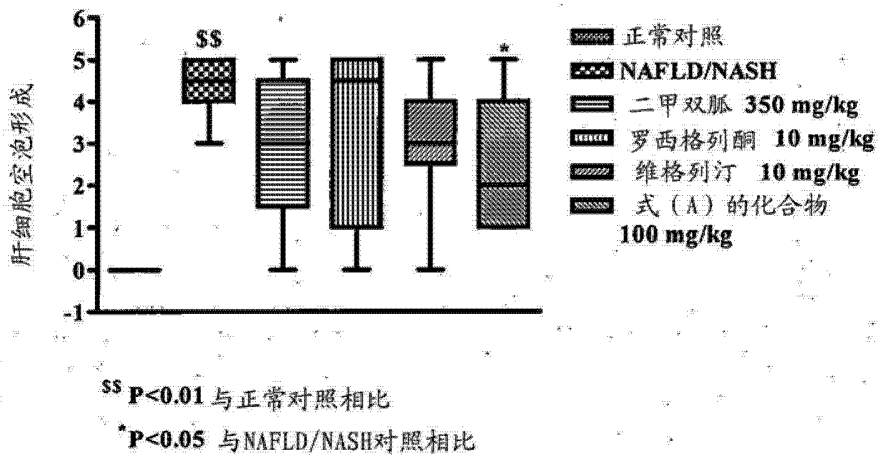


图 12

图 12：式 (A) 的化合物对超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 小鼠中肝细胞空泡形成的作用

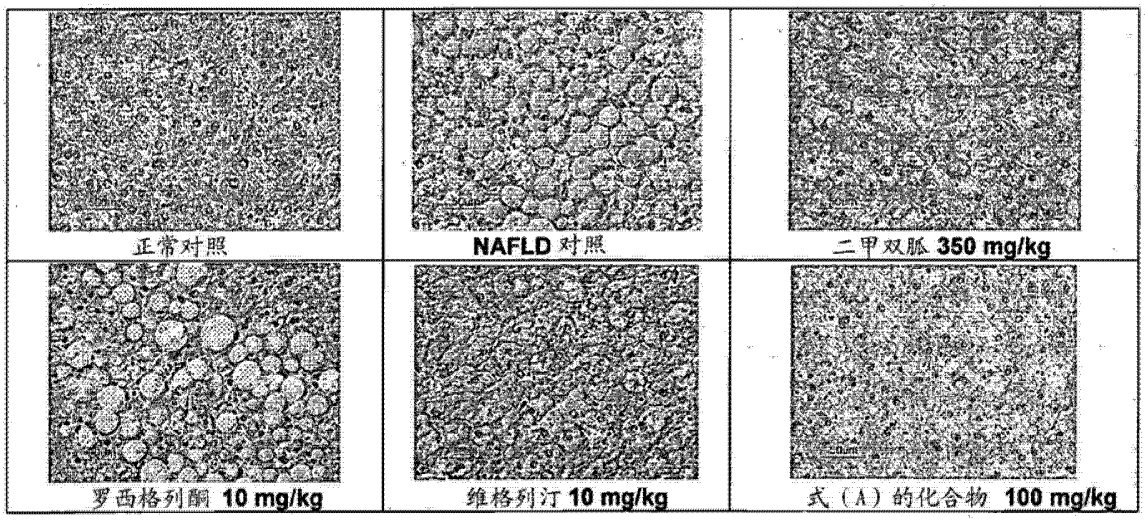


图 13

图 13：式 (A) 的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 中的肝脏组织病理学的作用

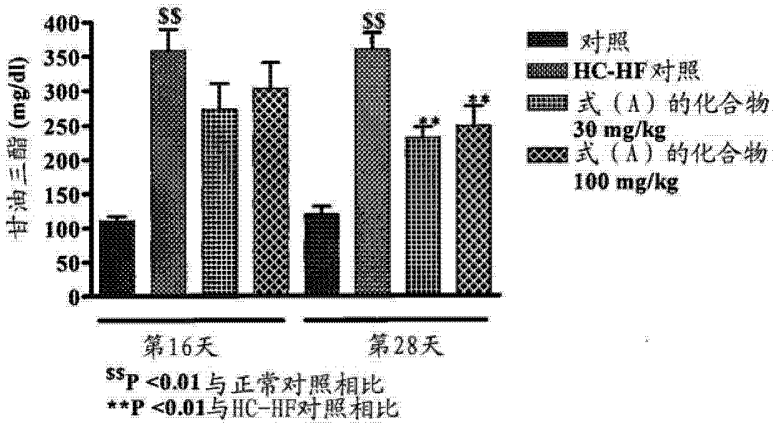


图 14

图 14：式 (A) 的化合物对 HC-HF 饮食饲喂的仓鼠中甘油三酯水平的作用

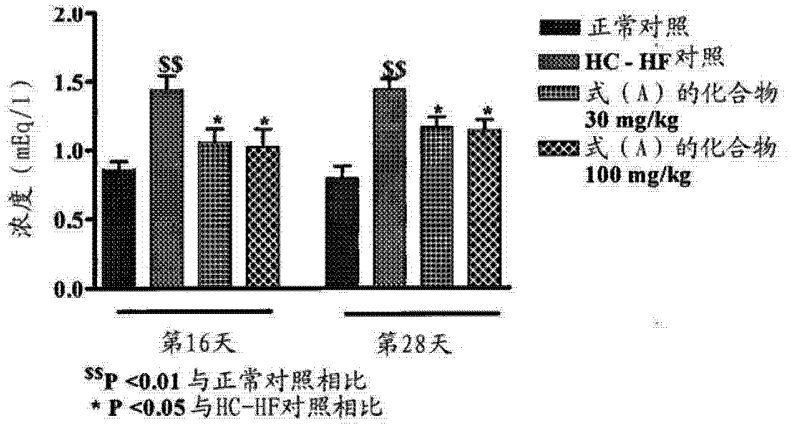


图 15

图 15：式 (A) 的化合物对 HC-HF 饮食饲喂的仓鼠中 NEFA 水平的作用

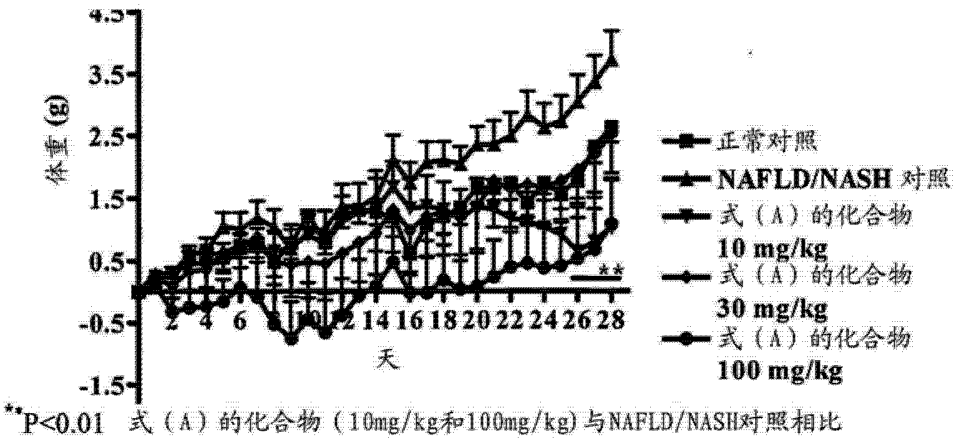


图 16

图 16：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠的体重增加的作用

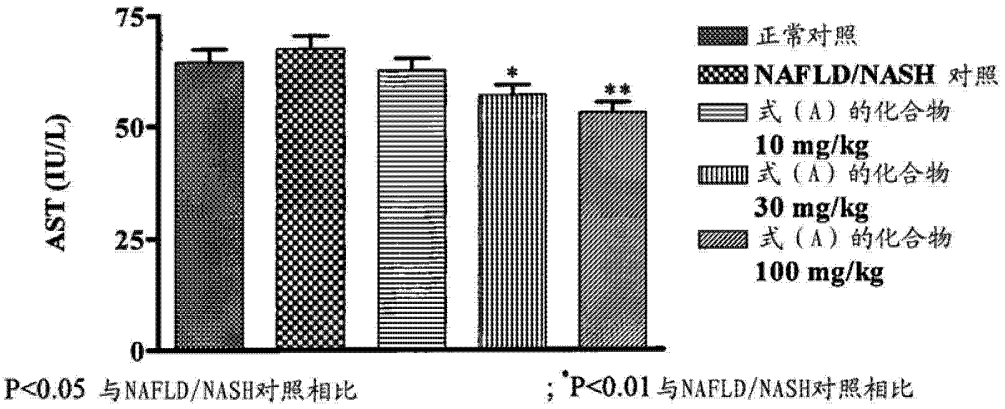


图 17

图 17：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中血浆 AST 的作用

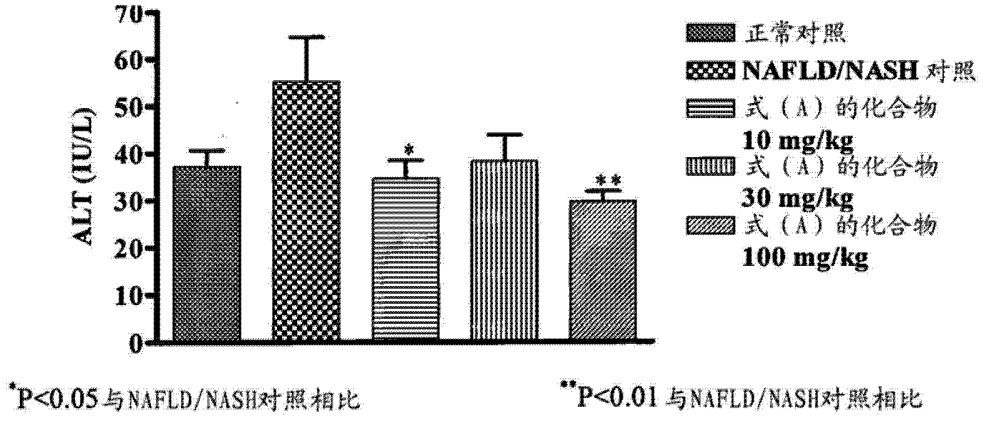


图 18

图 18：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中血浆 ALT 水平的作用

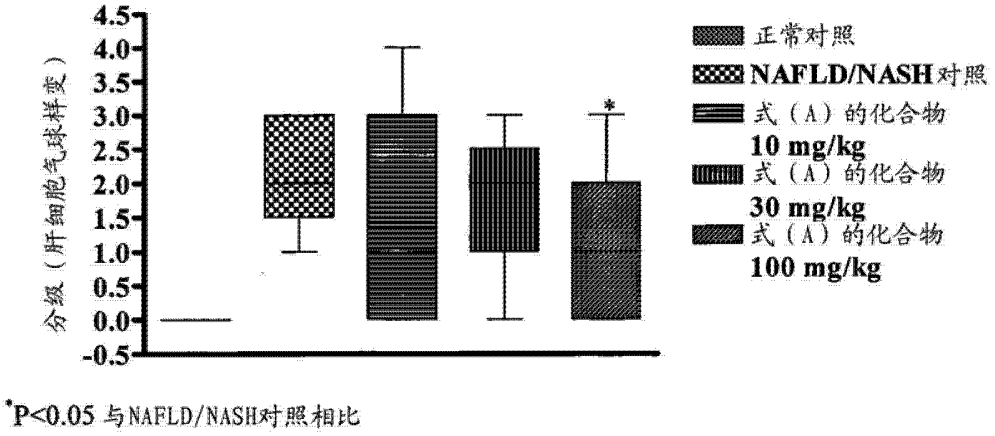


图 19

图 19：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝细胞气球样变的作用

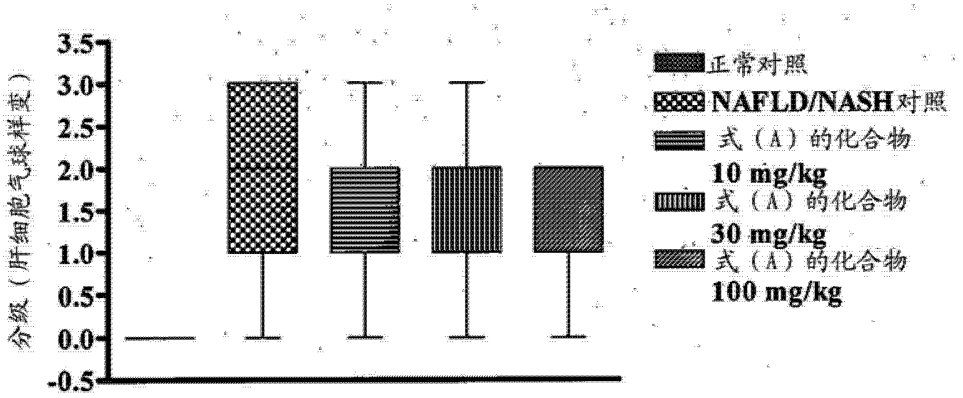


图 20

图 20：式 (A) 的化合物对 NAFLD/NASH 小鼠中肝脏脂肪变性的作用

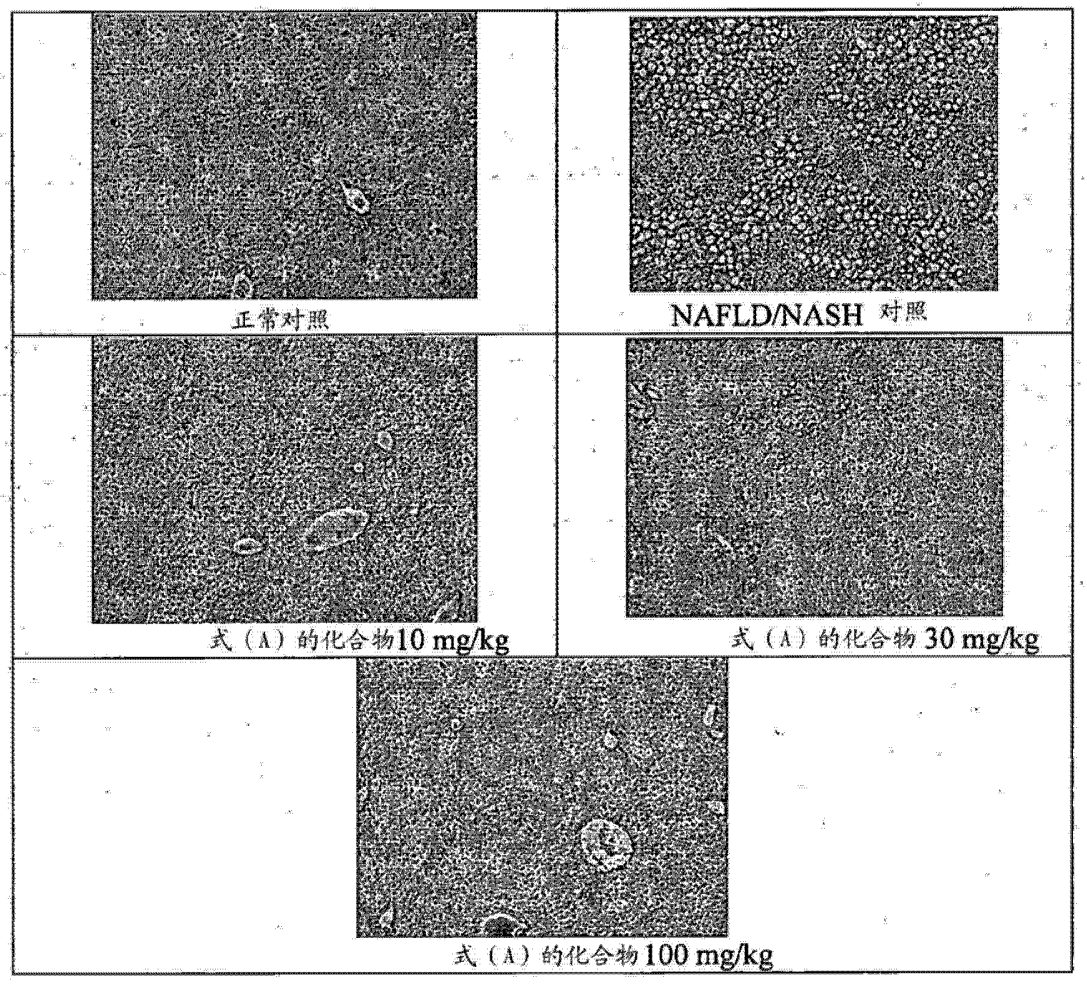


图 21

图 21：式 (A) 的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 中的肝脏组织病理学的作用

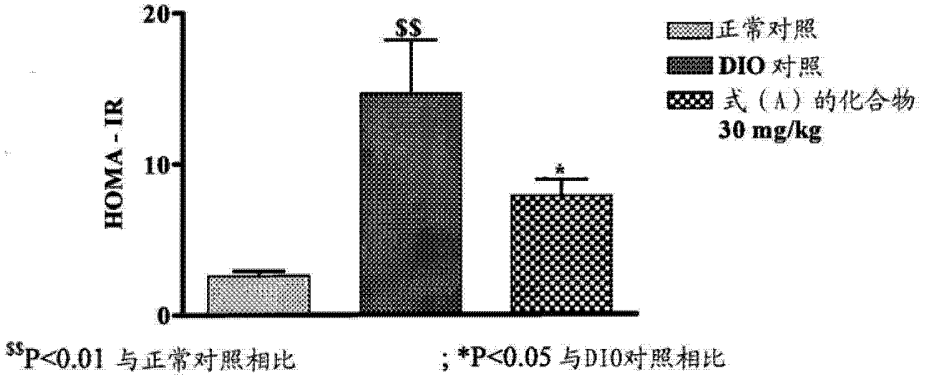


图 22

图 22：式 (A) 的化合物对 DIO 小鼠中 HOMA-IR 的作用

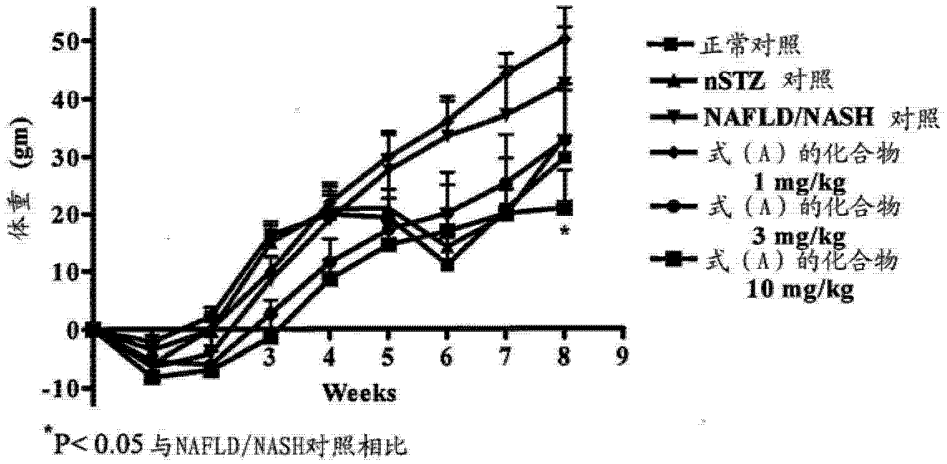


图 23

图 23：式 (A) 的化合物对 nSTZ 处理的大鼠中超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 中的体重增加的作用

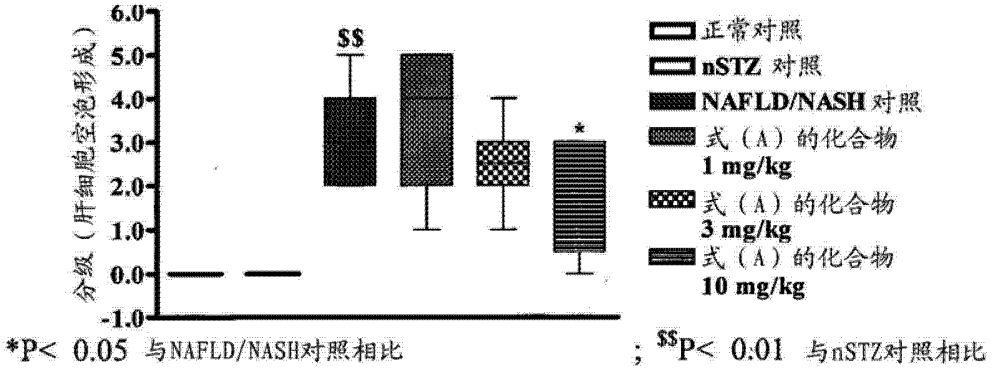


图 24

图 24：图示为式 (A) 的化合物对 nSTZ 处理的大鼠中超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 中肝脏空泡形成（脂肪变性）的作用的分级

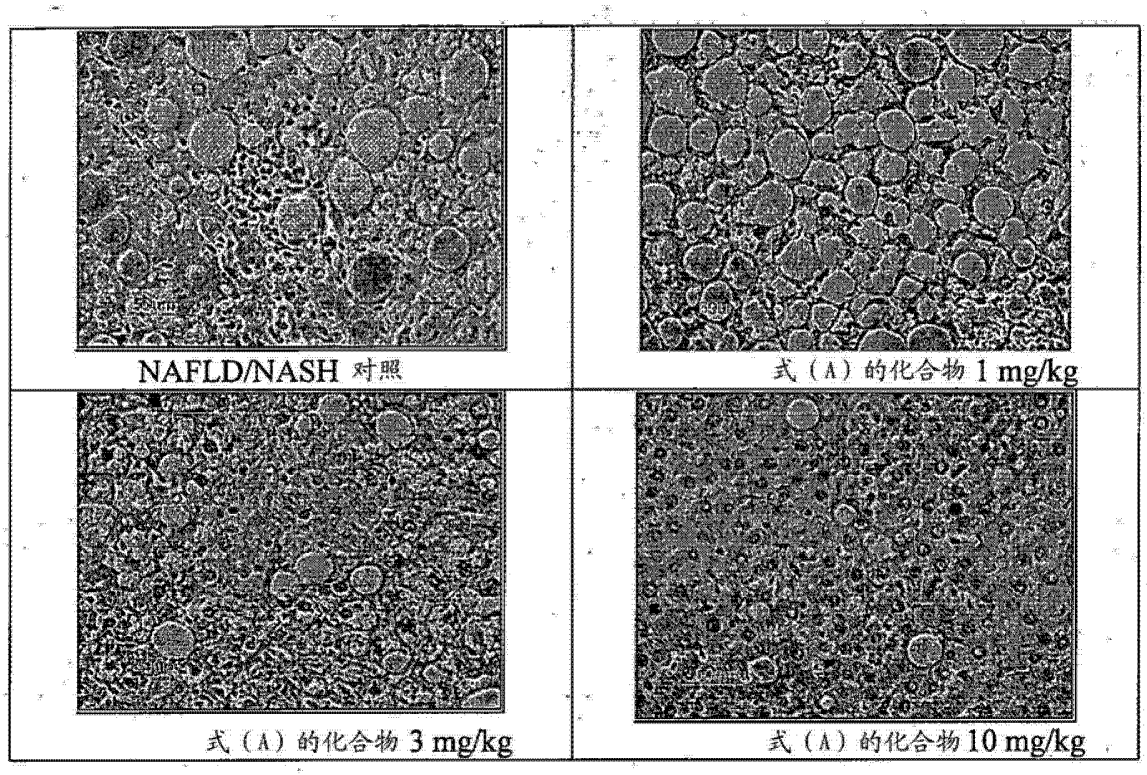


图 25

图 25：式 (A) 的化合物对 nSTZ 处理的大鼠中超营养饮食诱导 NAFLD/NASH 中的肝脏空泡形成（脂肪变性）的作用

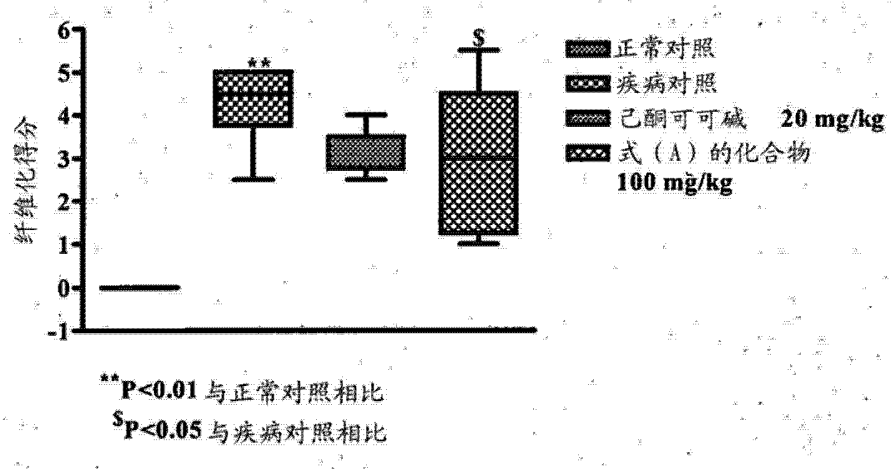


图 26

图 26：式 (A) 的化合物对 C57BL/6 小鼠中的博来霉素诱导的肺纤维化中肺组织病理学的作用

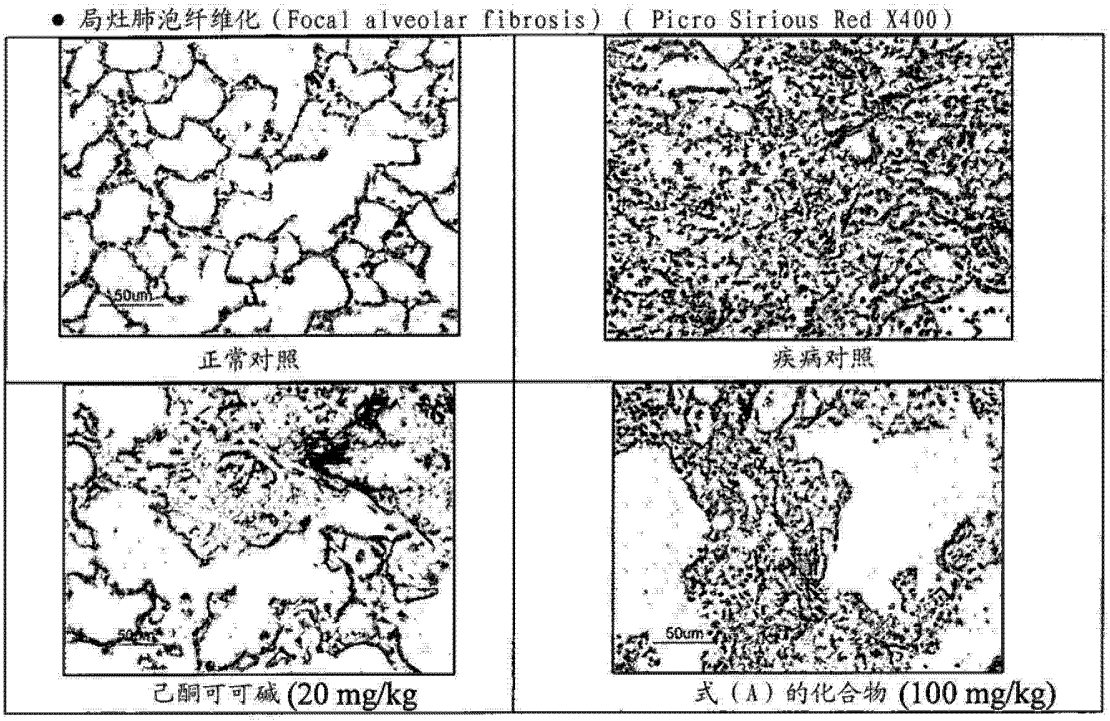


图 27

图 27：式 (A) 的化合物对 C57BL/6 小鼠的博来霉素诱导的肺纤维化中肺组织病理学的作用 (H&E 染色）

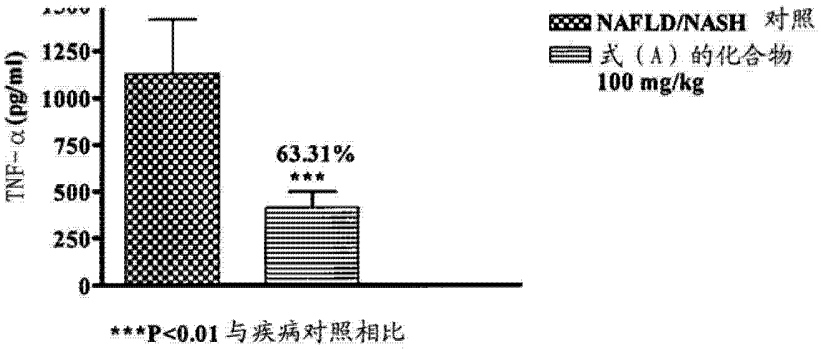


图 28

图 28：式 (A) 的化合物对脂多糖 (LPS) 激发的 NAFLD/NASH 小鼠中 TNF-α 水平的作用

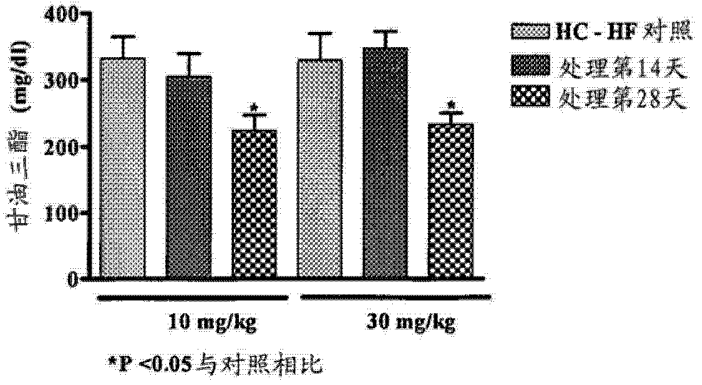


图 29

图 29：式 (C) 化合物的二钠盐对 HC-HF 饮食饲喂的仓鼠中血浆 TG 的作用

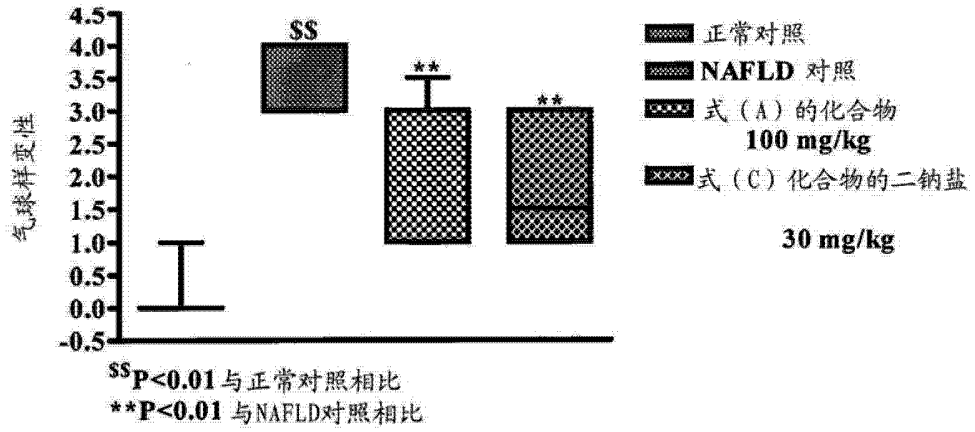


图 30

图 30：式 (A) 的化合物和式 (C) 化合物的二钠盐对超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 小鼠中肝细胞气球样变的作用

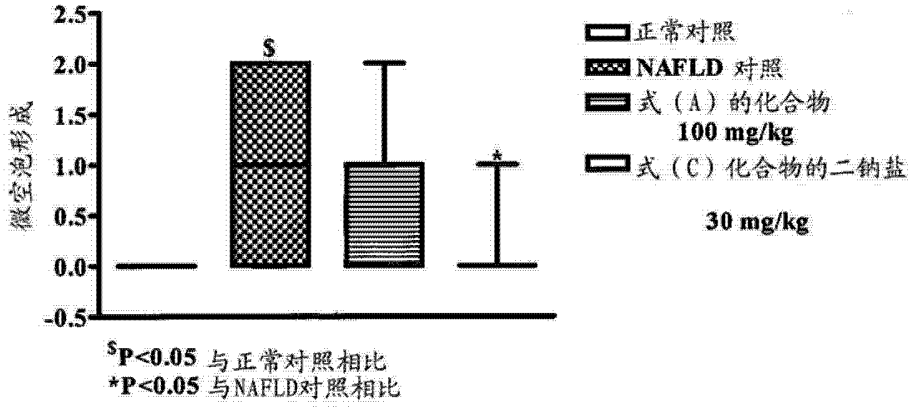


图 31

图 31：式 (A) 的化合物和式 (C) 化合物的二钠盐对超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 小鼠中微空泡形成的作用

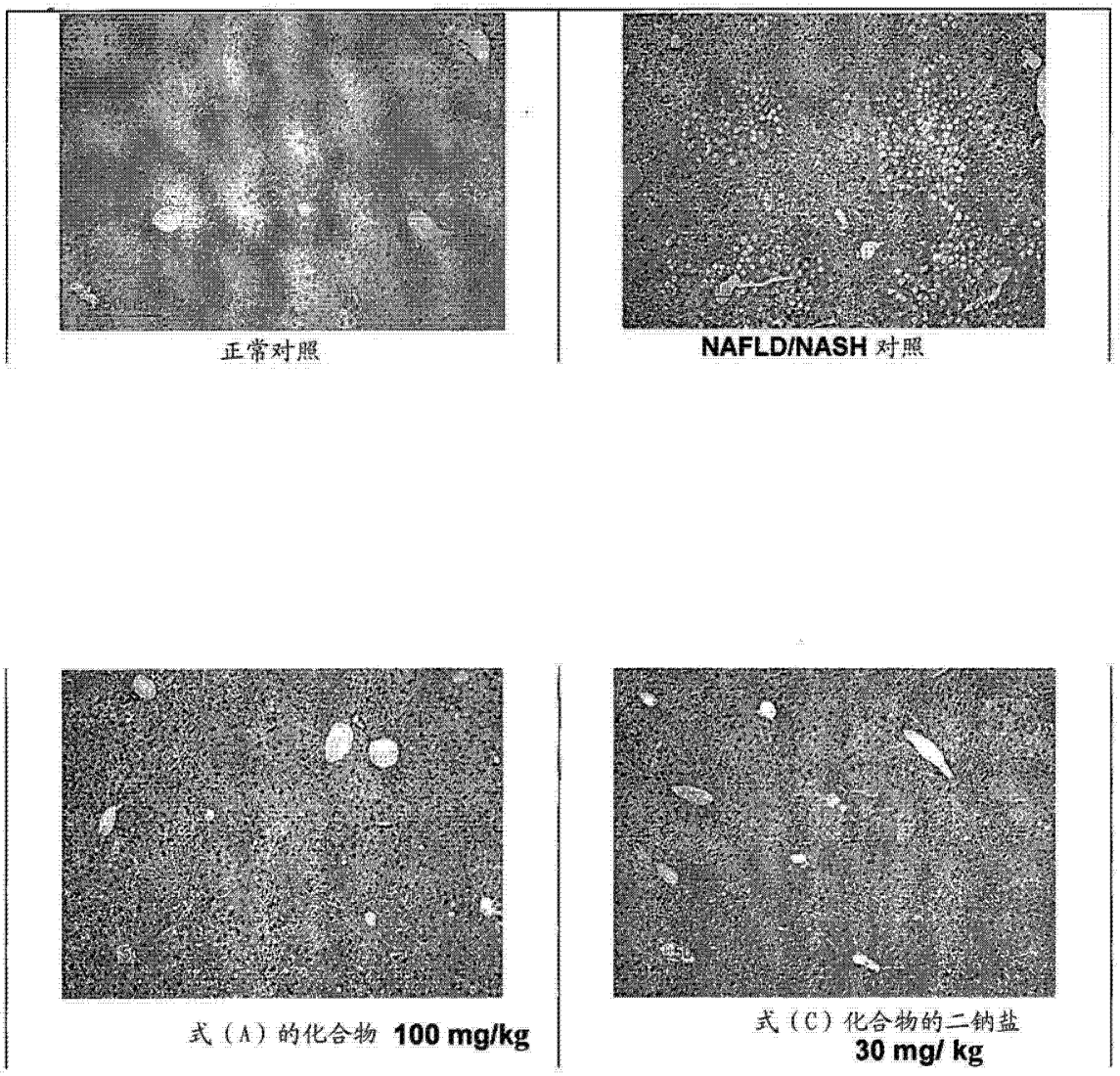


图 32

图 32：式 (A) 的化合物对 C57BL/6 小鼠中超营养饮食诱导的 NAFLD/NASH 中肝脏组织病理学的作用

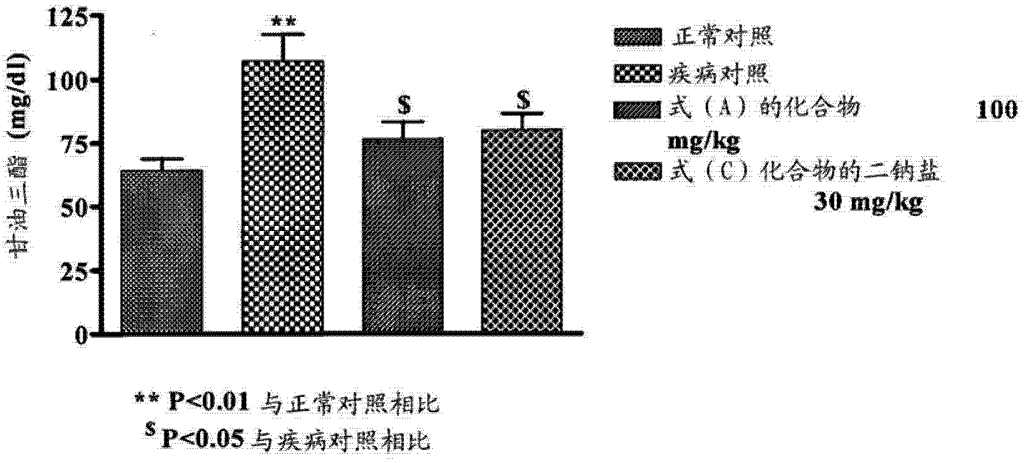


图 33

图 33：式 (A) 的化合物和式 (C) 化合物的二钠盐对小鼠中醇诱导急性高甘油三酯血症的血浆 TG 的作用

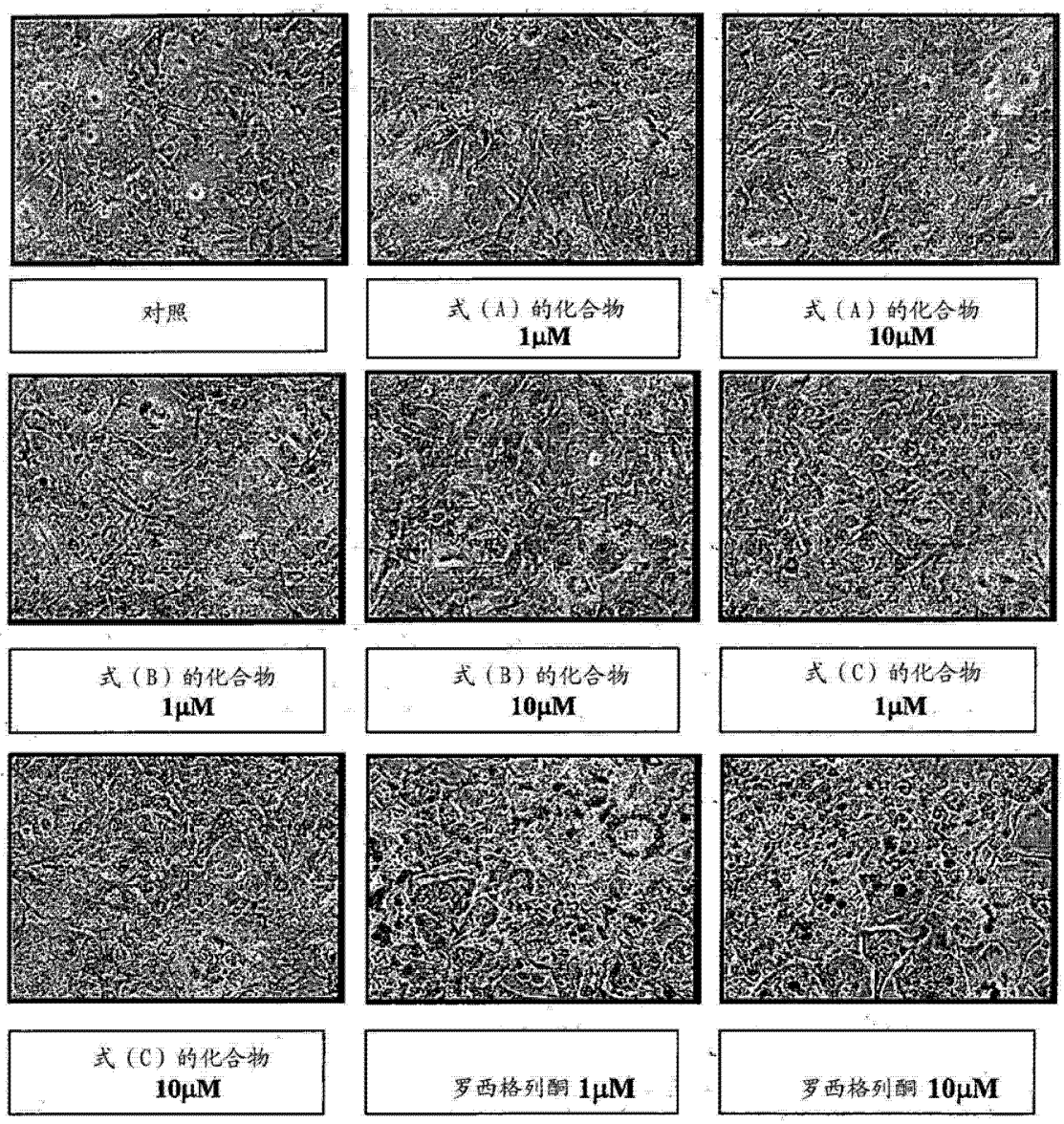
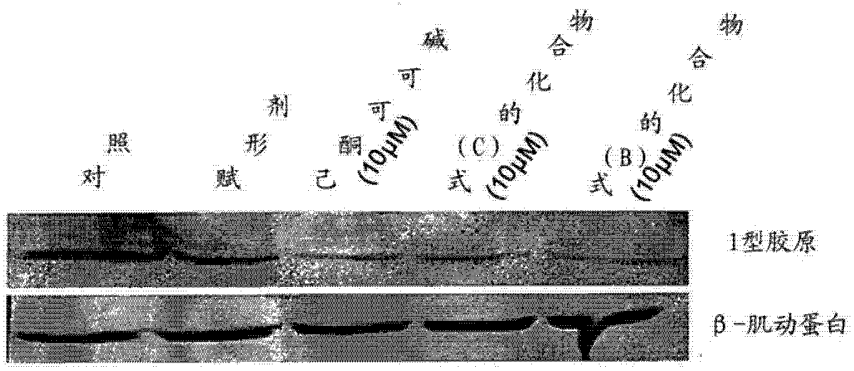


图 34

图 34：式 (A)、(B) 和 (C) 的化合物对 3T3-L1 小鼠成纤维细胞中脂肪形成的作用

(a)



(b)

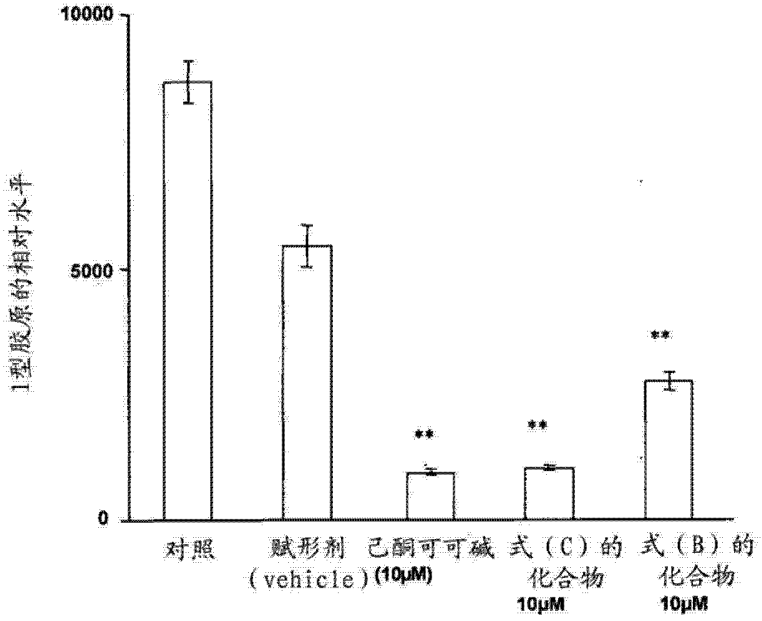


图 35a 和 35b

图 35a 和 35b：使用蛋白质印迹技术对式 (B) 和 (C) 的化合物处理的 HSC 中胶原分泌的评估

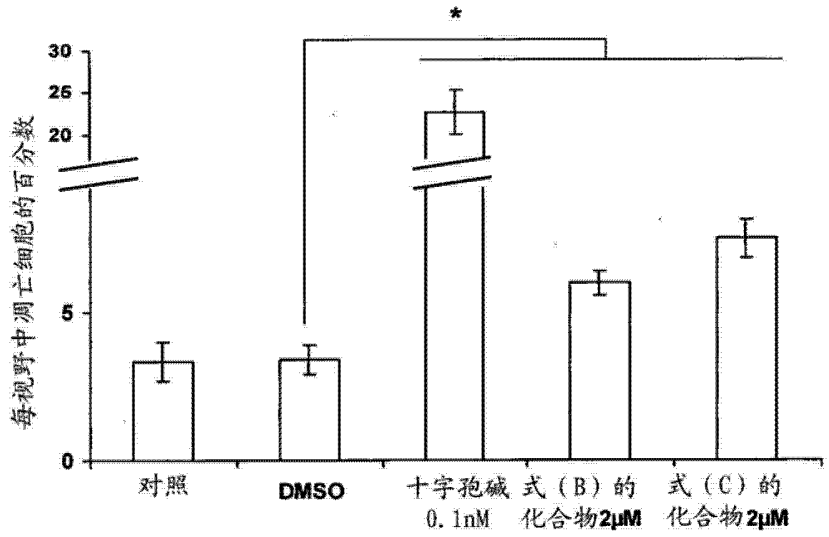


图 36

图 36：式 (B) 和 (C) 的化合物对 HSC 中细胞凋亡的诱导

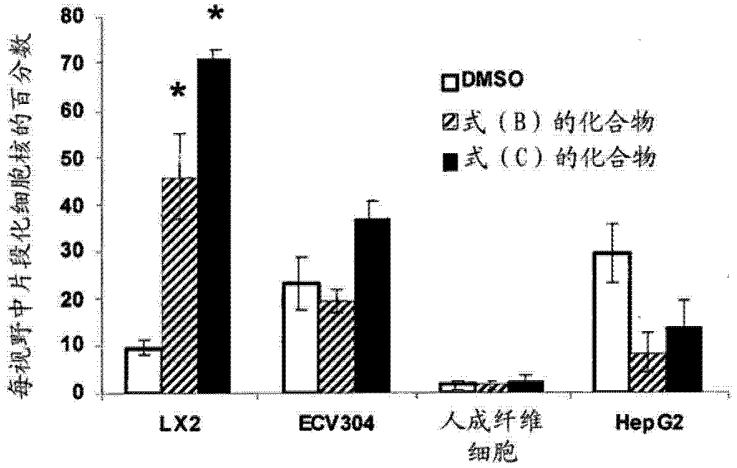


图 37

图 37：式 (B) 和 (C) 的化合物进行的细胞凋亡诱导是 HSC 选择性的

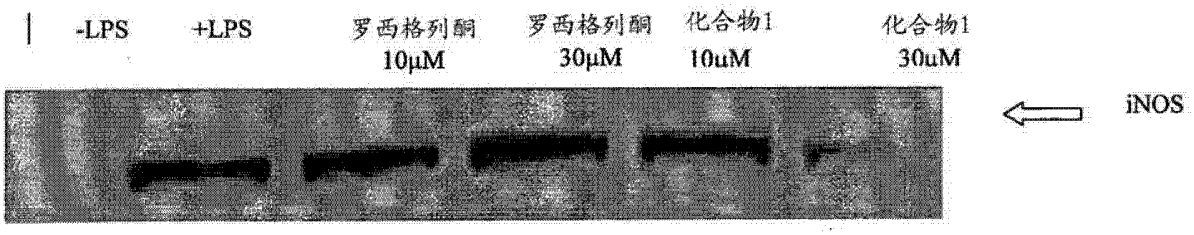


图 38

图 38：对 iNOS 产生的抑制作用

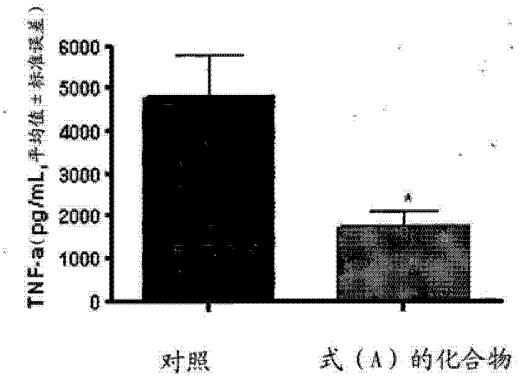


图 39

图 39：雄性 ob/ob 瘦对照小鼠经口服给予赋形剂 (n = 5) 和式 (A) 的化合物 (50mg/kg/ 天，n = 4)10 天后的血清 TNF-α 水平 (pg/dL)

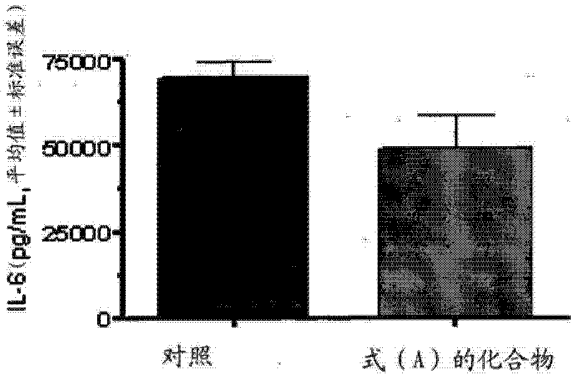


图 40

图 40：雄性 ob/ob 瘦对照小鼠经口服给予赋形剂 (n = 5) 和式 (A) 的化合物 (50mg/kg/ 天，n = 4)10 天后的血清 IL-6 水平 (pg/dL)

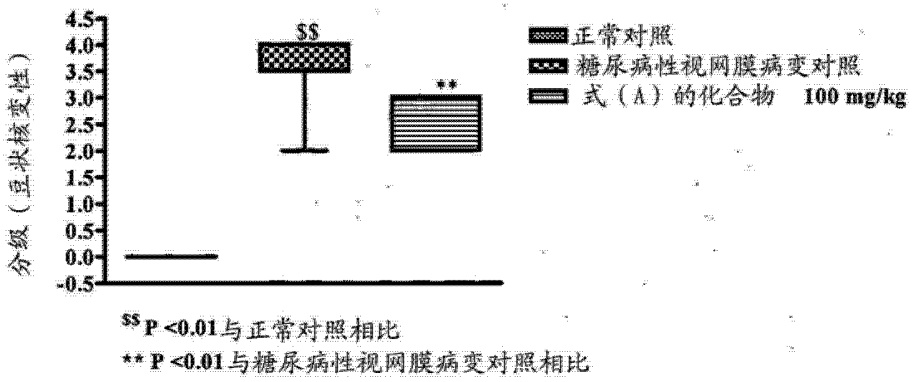


图 41

图 41：式 (A) 的化合物对 STZ 诱导的糖尿病大鼠中豆状核变性的作用