

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 6 月 12 日 (12.06.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/086104 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/385 (2006.01) A61K 9/50 (2006.01)
A61K 31/4436 (2006.01) A61K 9/72 (2006.01)
A61K 9/02 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2013/070166

(22) 国际申请日:

2013 年 1 月 7 日 (07.01.2013)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201210516800.X 2012 年 12 月 5 日 (05.12.2012) CN

(71) 申请人: 苏州大学 (SOOCHOW UNIVERSITY)

[CN/CN]; 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 程坚 (CHENG, Jian); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 敖桂珍 (AO, Guizhen); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。 贾佳 (JIA, Jia); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司

(UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护):

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

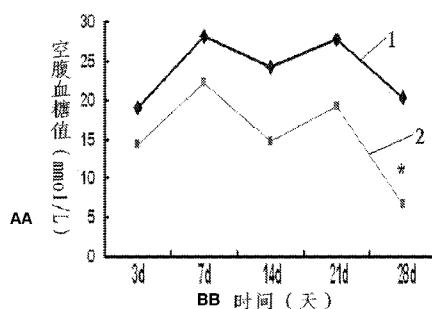
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,

[见续页]

(54) Title: AMPK ACTIVATOR AND APPLICATION THEREOF IN PREPARING DRUGS FOR TREATING DIABETES AND/OR DIABETES COMPLICATIONS

(54) 发明名称: 一种 AMPK 激活剂及其在制备治疗糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用



AA FASTING BLOOD-GLUCOSE LEVEL (MMOL/L)
BB TIME (DAY)

图 4(b) / Fig. 4(b)

(57) Abstract: The present invention relates to the field of drugs, and more particularly to an AMPK activator and an application thereof in preparing drugs for treating and/or preventing diabetes and/or diabetes complications. The present invention provides an application of a 3H-1,2-disulfoheterocyclic pentene-3-thione compound having the structure of the formula (I) as an AMPK activator, and an application of the 3H-1,2-disulfoheterocyclic pentene-3-thione compound in preparing drugs for treating and/or preventing diabetes and/or diabetes complications. Because such compounds do not contain biguanide group, during the use of the compound as an AMPK activator, the compound does not cause lactic acidosis, and prepared drugs for treating and/or preventing diabetes and/or diabetes complications are safer.

(57) 摘要: 本发明涉及药物领域, 尤其涉及一种 AMPK 激活剂及其在制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用。本发明提供了具有式 (I) 所示结构的 3H-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮类化合物作为 AMPK 激活剂的应用, 以及这类 3H-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮化合物在制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用。由于该类化合物中不含有双胍基团, 因此, 在作为 AMPK 激活剂使用时, 不会引起乳酸性酸中毒, 制备的治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物具有更高的安全性。

WO 2014/086104 A1



RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,

CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

-1-

一种 AMPK 激活剂及其在制备治疗糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用

5 本申请要求于2012年12月05日提交中国专利局、申请号为201210516800.X、发明名称为“一种AMPK激活剂及其在制备治疗糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

10 本发明涉及药物领域，尤其涉及一种AMPK激活剂及其在制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用。

背景技术

15 糖尿病是由多病因引起的疾病过程，影响到全球6%的人口。预计到2025年，患病人数会再增加一倍达到3亿。糖尿病的最重要的临床病理特征是血浆葡萄糖（血糖）浓度增高。血糖浓度增高是导致糖尿病的各种临床症状的主要原因。未控制的高血糖导致诸多糖尿病并发症，如增加微血管和大血管疾病风险，包括肾病，神经病，视网膜病，高血压，脑缺血和冠心病等。因此，降低血糖是治疗和预防糖尿病及其并发症的关键。

20 糖尿病主要分为I型糖尿病和II型糖尿病两大类，其中，I型糖尿病是由于各种病因导致的胰岛素绝对缺乏的糖尿病；II型糖尿病又称非胰岛素依赖性糖尿病，约占糖尿病患者总数的90%，虽然II型糖尿病的病因与遗传背景和生活方式有关，但其发病的基本因素均为胰岛素相对不足和(或)胰岛素抵抗（即机体对于胰岛素的反应能力下降）。在II型糖尿病的自然病
25 程中，起初胰岛 β 细胞由于胰岛素抵抗而代偿分泌过多的胰岛素，然后随着时间的延长由于胰岛 β 细胞衰竭而导致胰岛素缺乏和血糖增高。因此II型糖尿病并非由于胰岛素绝对缺乏而导致，而是由于机体对胰岛素刺激的反应能力不足，从而导致机体对葡萄糖的代谢和利用能力下降，进而导致高血糖。

30 目前对于糖尿病的治疗策略主要有两大类：一是给予外源性胰岛素治疗，二是提高机体对胰岛素的反应能力。胰岛素是机体内最重要的促进葡

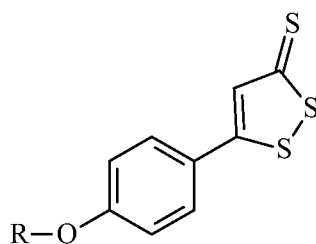
-2-

葡萄糖利用与代谢的内源性激素。胰岛素对于I型糖尿病，即由于各种病因导致的胰岛素绝对缺乏的糖尿病疗效较好。但对于II型糖尿病，如果不适当地再给予外源胰岛素治疗，会出现对葡萄糖不可修复的耐受性，从而进一步加重病情。因此，对II型糖尿病治疗的重要策略的是提高机体对胰岛素的反应能力。

AMPK作为一种重要的蛋白激酶参与多种代谢过程。AMPK在调节肌体能量代谢的平衡方面起总开关作用。在肌肉和肝脏中，AMPK的活化增强了葡萄糖的摄取、脂肪酸氧化作用和胰岛素敏感性，并且减少了葡萄糖、胆固醇和甘油三酯的产生。因此，AMPK及其信号通路是II型糖尿病有效药物作用靶点。事实上，目前在临床上广泛应用的双胍类降糖药，如二甲双胍、苯乙双胍和丁福明治就是AMPK激活剂。其中二甲双胍是目前临床上应用最广泛的一线抗糖尿病药物，不仅是首选的糖尿病治疗药物而且对正常血糖无影响。这表明AMPK是II型糖尿病药物治疗的关键作用靶点。

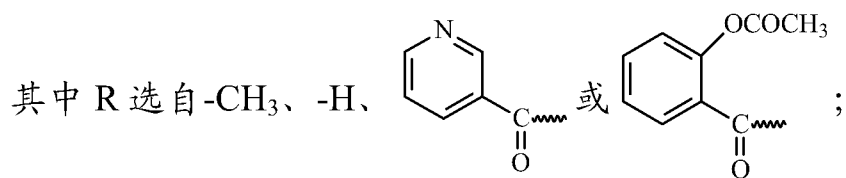
但是，目前这些在临床上广泛使用的双胍类AMPK激活剂的一个严重的副作用是会导致乳酸性酸中毒。乳酸性酸中毒是一类严重的代谢类疾病，一旦发生将危及生命。正是由于可导致乳酸性酸中毒，苯乙双胍等双胍类AMPK激活剂在欧美等国已被终止临床应用。虽然二甲双胍导致乳酸性酸中毒的几率较苯乙双胍低，但在口服降糖药中，其导致严重毒副反应及导致死亡的临床报告数最多，因此，研发新型、非双胍类AMPK激活剂作为糖尿病的治疗药物具有及其重要的临床意义。

3H-1, 2-二硫杂环戊烯-3-硫酮类化合物具有式I所示的结构，这类化合物具有相同的药效基团：即5-对羟基苯基-3H-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮，但不包含有双胍基团。



式I

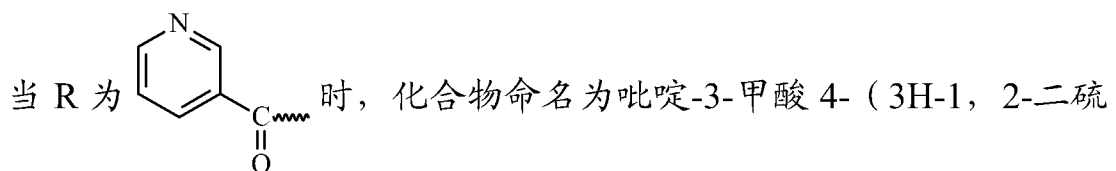
—3—



当 R 为 $-\text{CH}_3$ 时, 化合物命名为 5-对甲氧基苯基-3H-1, 2-二硫杂环戊烯-3-硫酮 (简称 HSD);

当 R 为 $-\text{H}$ 时, 化合物命名为 5-对羟基苯基-3H-1, 2-二硫杂环戊烯-3-

5 硫酮 (简称 HSD-OH);



杂环戊烯-3-硫酮-5-基)-苯酯 (烟酸的酯, 简称 HSD-3);



2, -二硫杂环戊烯-3-硫酮-5-基)-苯酯 (阿司匹林的酯, 简称 HSD-4)。

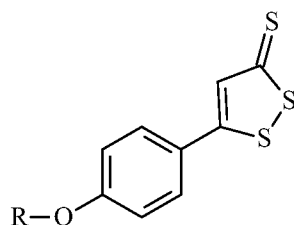
- 10 HSD-OH 是 HSD 的体内代谢产物。HSD 是临床上治疗胆囊炎和急慢性肝炎的药物。目前已知的 HSD 的药理作用有: 1) 促进胆汁排出, 使胆酸、胆色素及胆固醇等固体成分的分泌量显著增加, 特别是增加胆色素分泌; 2) 显著增强谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽还原酶等活性, 从而增强肝脏谷胱甘肽水平、肝细胞活力; 3) 催涎促消化作用, 对抗精神病药物引起的唾液减少特别有效; 能促进胃肠道蠕动和肠管内气体排出, 可消除消化不良症状; 4) 解毒作用; 能促进体内醇类物质快速代谢而消除, 对酒精、药物、食物等引起的中毒具有很好的解毒作用和抗过敏作用, 5) 降低血中胆固醇含量并防止其沉着或附着于血管内壁。但迄今从未有研究表明 HSD 以及其它 3H-1, 2-二硫杂环戊烯-3-硫酮类化合物具有激活
- 15
- 20 AMPK 的药理活性以及在治疗和/或预防糖尿病及其并发症中的作用。

发明内容

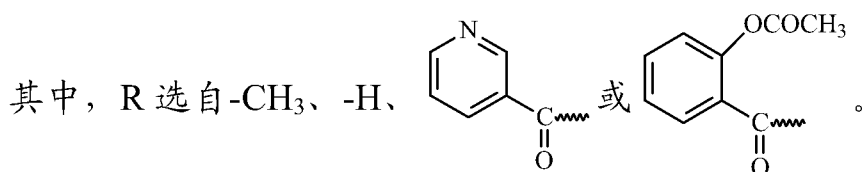
-4-

有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一类新的不含双胍基团的 AMPK 激活剂,以及 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物作为 AMPK 激活剂的应用及其在制备治疗和/或预防糖尿病及其并发症的药物中的应用。3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物不含双胍基团;其中 HSD 是治疗胆囊炎和急慢性肝炎的临床药物。HSD 在长期临床应用中从未被发现导致乳酸性酸中毒。因此,与目前临床上广泛使用的双胍类 AMPK 激活剂相比,3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物作为 AMPK 激活剂使用时,以及制备的治疗和/或预防糖尿病及其并发症的药物具有更高的安全性。

本发明提供了具有式I所示结构的化合物作为AMPK激活剂的应用

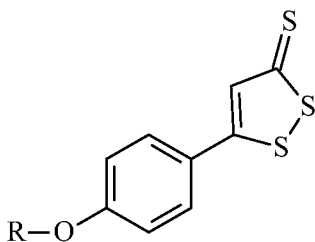


式I



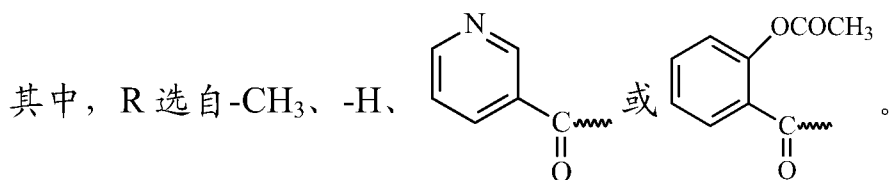
具有式 I 所示结构的化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物,其中 HSD 目前作为治疗胆囊炎和急慢性肝炎的药物,但 HSD、HSD-OH、HSD-3 和 HSD-4 激活 AMPK 及降血糖的作用从未见报道。

本发明还提供了具有式 I 所示结构的化合物在制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用



式I

—5—



优选地, 具有式 I 所示结构化合物可治疗和/或预防的糖尿病为 II 型糖尿病。

5 优选地, 具有式 I 所示结构化合物可治疗和/或预防的糖尿病并发症包括高血压、心脑血管疾病、肥胖、神经病、视网膜疾病、糖尿病肾病或多囊性卵巢综合症。

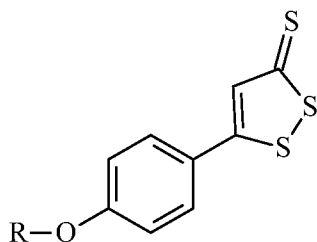
具有式 I 所示结构化合物具有 AMPK 激活活性和降血糖的作用, 故对糖尿病起治疗和/或预防作用。由于糖尿病的并发症主要是由高血糖导致, 降低血糖也是糖尿病并发症治疗和预防的关键措施; 另外, 炎症细胞的过度激活也是并发症发生和发展的重要原因, 而 AMPK 激活是抑制炎症细胞过度激活的关键机制。由于本发明提供的具有式 I 所示结构化合物具有降低血糖和激活炎症细胞 AMPK 的作用, 故式 I 所示结构的化合物可治疗和/或预防与 II 型糖尿病相关的糖尿病并发症, 如高血压、心脑血管疾病、肥胖、神经病、视网膜疾病、糖尿病肾病或多囊性卵巢综合症等, 10 以及 II 型糖尿病所导致的症状, 包括胰岛素抗性、葡萄糖不耐受性、高胰岛素血症等。

实验表明, 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物可显著降低由 STZ 诱导的 II 型糖尿病小鼠的血糖水平。本发明的实验数据还表明 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物在 LPS 导致的细胞炎症模型中能激活炎症细胞 AMPK。由于糖尿病的并发症主要是由高血糖导致, 降低血糖是治疗和预防糖尿病并发症的关键措施; 另外, 炎症细胞的过度激活也是导致并发症的重要因素, 而 AMPK 激活是抑制炎症细胞过度激活的关键机制。因此, 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物具有降血糖和通过激活 AMPK 抑制炎症的作用, 由此可以推理这类化合物对糖尿病的并发症也具有治疗 20 和/或预防作用。为了证实 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类对糖尿病并发症的治疗和/或预防作用, 本发明进一步以脑缺血为例, 表明 1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物对 II 型糖尿病的并发症脑缺血具有显著的脑保护作用 25

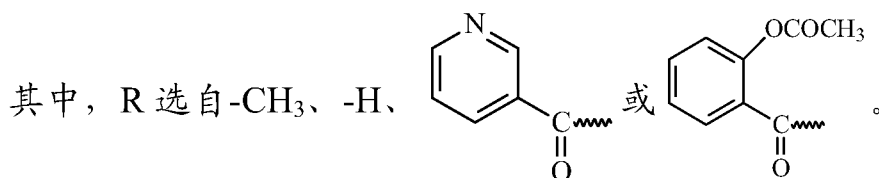
-6-

且可有效降低大脑缺血后 II 型糖尿病小鼠的死亡率。

本发明还提供了一种用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物，包括如式 I 所示结构的化合物和药学上可接受的辅料



式I



优选地，本发明提供的用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中添加的辅料为崩解剂、润滑剂、乳化剂、粘合剂。

10 优选地，本发明提供的用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中具有式 I 所示结构化合物的质量分数为 0.05%~99%。

优选地，本发明提供的用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的给药方式为局部给药、消化道给药或非消化道给药。

15 更优选地，本发明提供的用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的给药方式包括口服、注射、输入、直肠给药、鼻腔给药、口腔给药、舌下给药。

优选地，本发明提供的用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的剂型包括口服制剂、注射剂、栓剂或吸入剂。

其中，口服制剂为胶囊剂、微囊剂、丸剂、片剂、汤剂、颗粒剂、膏剂、分散粉末、露剂、口服液、滴丸剂、脂质体。

20 其中，注射剂为粉针剂或注射液。

更优选地，本发明提供的用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的注射剂用于皮下注射或输入、静脉注射或输入、肌肉注射或输入、腹膜内注射或输入、鞘内注射或输入、心室内注射或输入、胸骨内注射或输

-7-

入、颅内注射或输入或借助外植的储器用药。

优选地，本发明提供给的用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的用量以具有式 I 所示结构化合物的量计为 0.005 mg/kg/天~5000 mg/kg/天，即每天每千克动物体重使用具有 I 所示结构化合物的剂量为 0.005mg~5000mg。

本发明提供了具有式 I 所示结构的化合物作为 AMPK 激活剂的应用，其中式 I 所示化合物为 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，不含有双胍基团。其中 HSD 目前作为治疗胆囊炎和急慢性肝炎的药物。HSD 在长期临床应用中从未被发现导致乳酸性酸中毒。因此，与目前临床上广泛使用的双胍类 AMPK 相比，3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物作为 AMPK 激活剂使用时，以及制备的治疗糖尿病的药物具有更高的安全性。实验表明，在细胞模型上 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物能有效激活 AMPK，且激活效率高于目前在临床上广泛使用的一线抗糖尿病药物二甲双胍。在低剂量链脲佐菌素（STZ）诱导的 ICR 小鼠非胰岛素依赖性(II 型)糖尿病动物模型中，3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物能明显降低血糖。此外，在 STZ 诱导的 ICR 小鼠 II 型糖尿病合并脑缺血动物模型中，3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物显著降低糖尿病小鼠死亡率和脑梗死体积，表明 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物对糖尿病的并发症也有治疗和/或预防作用。

20

附图说明

图 1 示 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平；其中，图 1 (a) 示 HSD 在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平，P-AMPK 示 AMPK 活化水平（条带越深，表明活化程度越高），AMPK 示总 AMPK， β -actin 示内参，0 列示未添加 HSD-4 的巨噬细胞，1 列示添加 50 μ mol/L HSD 处理 30 min 后的巨噬细胞，2 列示添加 50 μ mol/L HSD 处理 60 min 后的巨噬细胞，3 列示添加 HSD 处理 120 min 后的巨噬细胞，4 列示添加 50 μ mol/L HSD 处理 240 min 后的巨噬细胞；图 1 (b) 示 HSD-OH 在不加 LPS 刺激的巨

-8-

噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未添加 HSD-OH 的巨噬细胞, 1 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-OH 处理 30 min 后的巨噬细胞, 2 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-OH 处理 60 min 后的巨噬细胞, 3 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-4 处理 120 min 后的巨噬细胞; 图 1(c) 示 HSD-3 在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未添加 HSD-3 的巨噬细胞, 1 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-4 处理 30 min 后的巨噬细胞, 2 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-3 处理 60 min 后的巨噬细胞, 3 列示添加 HSD-3 处理 50 $\mu\text{mol/L}$ 120 min 后的巨噬细胞, 4 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-3 处理 240 min 后的巨噬细胞, 5 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-3 处理 480 min 后的巨噬细胞; 图 1(d) 示 HSD-4 在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未添加 HSD-4 的巨噬细胞, 1 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-4 处理 30 min 后的巨噬细胞, 2 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-4 处理 60 min 后的巨噬细胞, 3 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-4 处理 120 min 后的巨噬细胞, 4 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-4 处理 240 min 后的巨噬细胞, 5 列示添加 50 $\mu\text{mol/L}$ HSD-4 处理 480 min 后的巨噬细胞;

图 2 示在 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上, 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物与二甲双胍对 AMPK 活化水平比较; 其中, 图 2(a) 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未经刺激的正常巨噬细胞, 1 列示 LPS 致炎处理 30 min 后的检测结果, 2 列示 LPS 致炎处理 60 min 后的检测结果, 3 列示 LPS 致炎处理 120 min 后的检测结果, 4 列示 LPS 致炎处理 240 min 后的检测结果, 5 列示 LPS 致炎处理 480 min 后的检测结果, 6 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 处理 30 min 后检测结果, 7 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 处理 60 min 后检测结果, 8 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 处理 120 min 后检测结果, 9 列示 LPS

-9-

致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 处理 240 min 后检测结果, 10 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 处理 480 min 后检测结果; 图 2 (b) 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未经刺激的正常巨噬细胞, 1 列示 LPS 致炎处理 30 min 后检测结果, 2 列示 LPS 致炎处理 60 min 后检测结果, 3 列示 LPS 致炎处理 120 min 后检测结果, 4 列示 LPS 致炎处理 240 min 后检测结果, 5 列示 LPS 致炎处理 480 min 后检测结果, 6 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 处理 30 min 后检测结果, 7 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 处理 60 min 后检测结果, 8 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 处理 120 min 后检测结果, 9 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 处理 240 min 后检测结果, 10 列示 LPS 致炎条件下添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 处理 480 min 后检测结果; 图 2 (c) 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的二甲双胍对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未经刺激的正常巨噬细胞, 1 列示 LPS 致炎处理 30 min 后检测结果, 2 列示 LPS 致炎处理 60 min 后检测结果, 3 列示 LPS 致炎处理 120 min 后检测结果, 4 列示 LPS 致炎处理 240 min 后检测结果, 5 列示 LPS 致炎处理 480 min 后检测结果, 6 列示 LPS 致炎条件下添加 500 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 30 min 后检测结果, 7 列示 LPS 致炎条件下添加 500 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 60 min 后检测结果, 8 列示 LPS 致炎条件下添加 500 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 120 min 后检测结果, 9 列示 LPS 致炎条件下添加 500 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 240 min 后检测结果, 10 列示 LPS 致炎条件下添加 500 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 480 min 后检测结果; 图 2 (d) 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上终浓度为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的二甲双胍对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未经刺激的正常巨噬细胞, 1 列示 LPS 致炎处理 30 min 后检测结果, 2 列示 LPS 致炎处理 60 min 后检测结果, 3 列示 LPS 致炎处理 120 min 后检测结果, 4 列示 LPS 致炎处理 240 min 后

-10-

检测结果, 5 列示 LPS 致炎处理 480 min 后检测结果, 6 列示 LPS 致炎条件下添加 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 30 min 后检测结果, 7 列示 LPS 致炎条件下添加 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 60 min 后检测结果, 8 列示 LPS 致炎条件下添加 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 120 min 后检测结果, 9 列示 LPS 致炎条件下添加 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 240 min 后检测结果, 10 列示 LPS 致炎条件下添加 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍处理 480 min 后检测结果;

图 3 示 HSD (50 $\mu\text{mol/L}$) 对人源细胞 KEK293T 中 AMPK 的激活作用 P-AMPK 示 AMPK 活化水平, AMPK 示总 AMPK, β -actin 示内参, 0 列示未加 HSD 处理的对照细胞组, 1 列示给药实验组给药 30 min 后检测结果, 2 列示给药实验组给药 60 min 后检测结果, 3 列示给药实验组给药 120 min 后检测结果, 4 列示给药实验组给药 240 min 后试验结果, 5 列示给药实验组给药 480 min 后试验结果;

图 4 示低剂量 STZ 诱导的 II 型糖尿病 ICR 小鼠模型上, 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物对小鼠血糖水平的影响。图 4 (a) 示在 STZ 诱导的 II 型糖尿病 ICR 小鼠模型上, HSD 对小鼠非空腹血糖水平的影响, 其中, 纵坐标为小鼠非空腹血糖值, 柱 1 示溶剂注射组小鼠非空腹血糖水平, 柱 2 示 HSD 给药组小鼠非空腹血糖水平, * 示在 $p<0.05$ 水平下有显著性差异; 图 4 (b) 示在 STZ 诱导的 II 型糖尿病 ICR 小鼠模型上, HSD 对小鼠空腹血糖水平的影响, 其中, 横坐标为注射后的时间, 纵坐标为小鼠空腹血糖值, 曲线 1 示溶剂注射组小鼠空腹血糖水平, 曲线 2 示 HSD 给药组小鼠空腹血糖水平, * 示在 $p<0.05$ 水平下有显著性差异;

图 5 示低剂量 STZ 诱导的 II 型糖尿病及合并脑缺血的 ICR 小鼠动物模型上 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物对脑梗死体积和小鼠死亡率的影响; 其中, 图 5 (a) 示在 II 型糖尿病及合并脑缺血的 ICR 小鼠动物模型上 HSD 对脑梗死体积的影响, 其中, 纵坐标为脑梗死体积, $\square$ 示 HSD 给药组小鼠脑梗死体积, $\blacksquare$ 示溶剂注射组小鼠脑梗死面积, * 示在 $p<0.05$ 水平下有显著性差异, 柱 1 示皮层梗死面积, 柱 2 示纹状体梗死体积, 柱 3 示半球梗死体积; 图 5 (b) 示在 II 型糖尿病及合并脑缺血的 ICR 小鼠

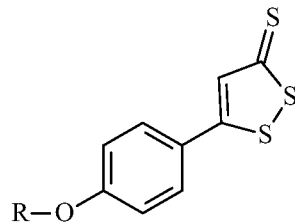
-11-

动物模型上 HSD 对小鼠死亡率的影响，其中，纵坐标为小鼠死亡率，柱 1 示溶剂注射组小鼠死亡率，柱 2 示 HSD 给药组小鼠死亡率。

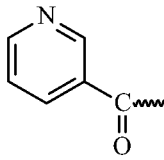
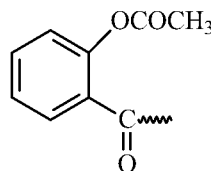
具体实施方式

- 5 本发明提供了具有式 I 所示结构的化合物作为 AMPK 激活剂的应用，及在制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，
- 10 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和

本发明提供了具有式 I 所示结构的化合物作为 AMPK 激活剂的应用

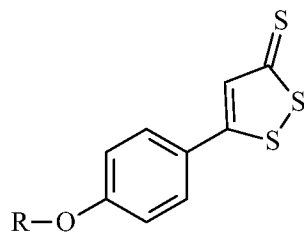


式I

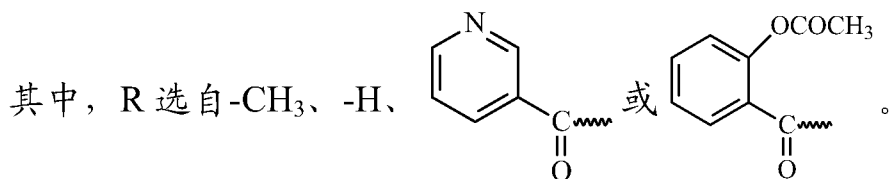
- 15 其中，R 选自 -CH₃、-H、 或 。

- 具有式 I 所示结构的化合物为 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，不包含双胍基团。其中 HSD 目前作为治疗胆囊炎和急慢性肝炎的药物。HSD 在长期临床应用中从未被发现导致乳酸性酸中毒。因此，与目前临床上广泛使用的双胍类 AMPK 相比，3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物作为 AMPK 激活剂使用并制备治疗糖尿病的药物具有更高的安全性。
- 20 本发明还提供了具有式 I 所示结构的化合物在制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用

- 12 -



式I



II 型糖尿病为非胰岛素依赖糖尿病，因胰岛素相对不足导致，因此，
5 具有式 I 所示结构化合物可用于治疗和/或预防的糖尿病为 II 型糖尿病。

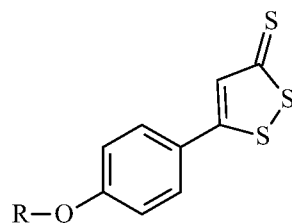
其中，具有式 I 所示结构化合物可治疗和/或预防的糖尿病并发症包括高血压、心脑血管疾病、肥胖、神经病、视网膜疾病、糖尿病肾病或多囊性卵巢综合症等。

具有式 I 所示结构化合物具有 AMPK 激活活性和降血糖的作用，故
10 对糖尿病起治疗和/或预防作用。由于糖尿病的并发症主要是由高血糖导致，降低血糖也是糖尿病并发症治疗和预防的关键措施；另外，炎症细胞的过度激活也是糖尿病并发症发生和发展的重要原因，AMPK 激活是抑制过度炎症细胞激活的关键机制。由于本发明提供的具有式 I 所示结构化合物具有降低血糖和激活炎症细胞 AMPK 的作用，故式 I 所示结构的化
15 合物可治疗和/或预防与 II 型糖尿病相关的糖尿病并发症，如高血压、心脑血管疾病、肥胖、神经病、视网膜疾病、糖尿病肾病或多囊性卵巢综合症等，以及 II 型糖尿病所导致的症状，包括胰岛素抗性、葡萄糖不耐受性、高胰岛素血症等。

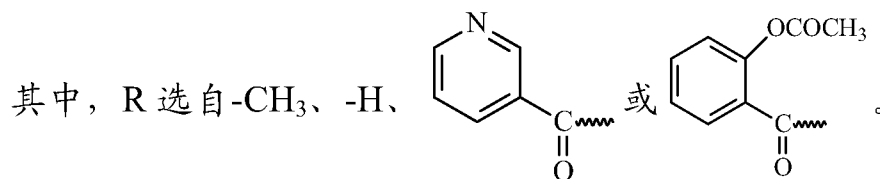
研究表明，3H-1，2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物可显著降低由低剂
20 量 STZ 诱导的 II 型糖尿病小鼠的血糖水平；并且还可通过降低血糖、通过激活 AMPK 抑制炎症细胞的过度激活从而治疗和/或预防糖尿病并发症。

本发明还提供了一种用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物，包括如式 I 所示结构的化合物和药学上可接受的辅料

- 13 -



式I



5 本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中添加的辅料为崩解剂、润滑剂、乳化剂、粘合剂。

为达到治疗或预防效果，本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中具有式 I 所示结构化合物的质量分数为 0.05%~99%。

10 为达到更好的治疗或预防效果，本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中具有式 I 所示结构化合物的质量分数为 15%~60%。

为了使用方便且有效，本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的给药方式为局部给药、消化道给药或非消化道给药。

15 本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的给药方式本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的给药方式包括口服、注射、输入、直肠给药、鼻腔给药、口腔给药、舌下给药。

20 本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物的剂型包括口服制剂、注射剂、栓剂或吸入剂。

其中，口服制剂为胶囊剂、微囊剂、丸剂、片剂、汤剂、颗粒剂、膏剂、分散粉末、露剂、口服液、滴丸剂、脂质体。

其中，注射剂为粉针剂或注射液。

为满足使用要求，本发明提供的用于治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿

-14-

病并发症的注射剂用于皮下注射或输入、静脉注射或输入、肌肉注射或输入、腹膜内注射或输入、鞘内注射或输入、心室内注射或输入、胸骨内注射或输入、颅内注射或输入或借助外植的储器用药。

根据治疗效果和疾病严重程度，本发明提供给的用于治疗 and/or 预防
5 糖尿病和/or 糖尿病并发症的药物的用量以具有式 I 所示结构化合物的量计为 0.005 mg/kg/天~5000 mg/kg/天，即每天每千克动物体重使用具有 I 所示结构化合物的剂量为 0.005mg~5000mg。

目前在临床上广泛应用的双胍类 AMPK 激活剂的一个严重副作用是
10 乳酸性酸中毒。本发明提供的 3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物不含
有双胍基团，其中 HSD 目前作为治疗胆囊炎和急慢性肝炎的临床药物。
HSD 在长期临床应用中从未被发现导致乳酸性酸中毒。因此，与目前临
床上广泛使用的双胍类 AMPK 相比，3H-1, 2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合
物作为 AMPK 激活剂并制备治疗糖尿病的药物具有更高的安全性。实验
表明，在细胞模型上 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物能有效激活
15 AMPK，且激活效率高于目前在临床上广泛使用的一线抗糖尿病药物二甲
双胍。在低剂量链脲佐菌素（STZ）诱导的 ICR 小鼠非胰岛素依赖性(II
型)糖尿病动物模型中，3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物能明显降低血
糖。此外，以脑缺血为例，在 STZ 诱导的 ICR 小鼠 II 型糖尿病合并脑缺
血动物模型中，3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物显著降低糖尿病小鼠
20 死亡率和脑梗死体积，表明 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物对糖尿病
的并发症也有治疗和预防作用。

本发明所用试剂或材料皆为普通市售品，皆可由市场购得。其中：小
鼠巨噬细胞系购自美国标准生物品收藏中心（ATCC）；人源 HEK293T 细
胞购自中国科学院细胞库；ICR 小鼠，雄性，周龄 8 周，体重 34±2.0g，
25 购自中科院上海实验动物中心，饲养于室温环境下，明暗周期 12 h，自由
进食，饮水不限；6 孔和 96 孔细胞培养板购自美国 Corning 公司；高糖
DMEM 购自美国 GIBCO 公司；胎牛血清（FBS）购自美国 Hyclone 公司；
0.25%胰酶、链霉素-青霉素、磷酸盐缓冲液（PBS，0.01M，pH=7.40）、
Western Blot 装置、酶标仪、凝胶成像仪购自美国 BIO-RAD 公司；RIPA

-15-

裂解液、蛋白酶抑制剂 (PMSF, 100 $\mu\text{mol/L}$)、磷酸酶抑制剂 (100 $\mu\text{mol/L}$) 购自中国碧云天公司; 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; BCA 蛋白浓度测试试剂盒、恒温培养箱、ECL 显影液 (RPN2232) 购自美国 Thermo 公司; 二甲亚砜 (DMSO)、玉米油、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 5 购自 sigma 公司; 链脲菌素 (STZ) 购自 Solarbio LIFE SCIENCE 公司; 1 mL 注射器购自上海米沙瓦医科工业医科有限公司; 普通饲料购自苏州双狮实验动物饲料科技有限公司; 小鼠固定器、血糖仪、血糖试纸及采血针购自 ACCU-CHEK 公司; 体重计购自 METTLER TOLEDO 公司; 0.9% 生理盐水购自安徽双鹤药业; 异氟烷购自山东科源制药公司; 4% 多聚甲醛 10 购自国药集团化学试剂有限公司; XTS-4A 手术显微镜购自江苏镇江中天光学仪器有限责任公司; 电热恒温水槽 SSW-600-2S 购自上海博讯实业有限公司; 数码相机购自 Canon 公司, 激光多普勒脑血流测定仪 PeriFlux system 5000 购自 PERIMAD AB 公司。

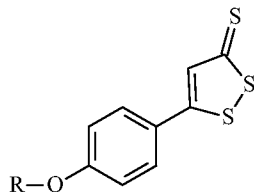
下面结合实施例进一步阐述本发明:

15

实施例 1 式 I 所示化合物对巨噬细胞 AMPK 的激活

将小鼠巨噬细胞系细胞由液氮罐中取出后迅速置于 37°C 温水中轻轻摇晃解冻, 1000 转离心 3 min, 弃除上清, 将细胞在 FBS 的质量分数为 10% 的 DMEM 培养基中培养, 当细胞在培养皿中覆盖率达 60%~70% 时进行传代培养。传代的细胞覆盖率达 60%~70% 后, 1000 转离心 3 min 获取 20 细胞, 用台盼蓝染色, 用血球计数仪于显微镜下计数。将计数后的细胞稀释至浓度为 15 万/mL~20 万/mL, 进行铺 96 孔板, 1.5 万/孔~2.0 万/孔。

配制 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物溶液, 称取式 I 所示化合物, 以 DMSO 溶解, 使溶液的终浓度以质量浓度计为 100 mmol/L。

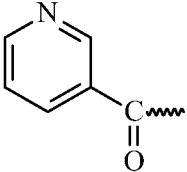
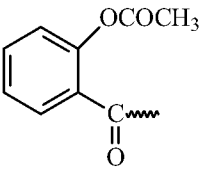


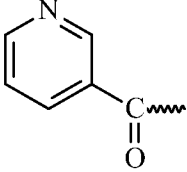
式I

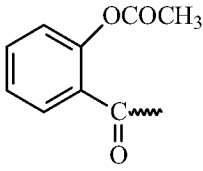
25

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选

-16-

自-CH₃、-H、 或 。当 R 为-CH₃ 时, 化合物为 HSD,

当 R 为-H 时, 化合物为 HSD-OH; 当 R 为  时, 化合物为 HSD-3;

当 R 为  时, 化合物为 HSD-4。

细胞培养 24 h 后, 分别加入 HSD 溶液、HSD-OH 溶液、HSD-3 溶液
5 和 HSD-4 溶液使在细胞中的终浓度为 50 μmol/L, 并在对照组细胞中加入
等体积的 DMSO, 在培养箱中继续培养。在加药后 30 min、60 min、120
min、240 min 及 480 min 时, 取样并以 RIPA 裂解液提取细胞蛋白, 方法
为: 加入 RIPA 裂解液 40 μL, 反复吹打细胞, 将吹打下来的细胞匀浆置
于 500μL 离心管中, 在冰上静置 30 min 以充分裂解细胞, 30 min 后转移
10 离心管至高速离心机, 在 4℃ 条件下, 13200rpm 离心 20 min~25 min, 吸
取上清也 (含细胞蛋白质) 至另一个离心管中, 并储存于-80℃冰箱。提
取的细胞蛋白采用二喹啉甲酸 (BCA) 测蛋白浓度。

制备 SDS-聚乙丙烯蛋白电泳胶, 待凝胶聚合后, 每个加样孔加入 30
mg 细胞蛋白样品, 先以恒压 60 V 进行电泳。待蛋白分子量标记跑开后,
15 改用恒压 100V。电泳结束后, 以恒流 350 mA 将 SDS-聚乙丙烯蛋白电泳
胶上的蛋白转移至 PVDF 纤维膜上, 持续转膜 115 min。转膜结束后, 取
出 PVDF 膜, 用牛奶的体积分数为 5% 的 1×TBST 封闭液封闭 2 小时。封
闭结束后, 用 1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次, 分别孵育 AMPK 抗
体[用含 0.5% BSA(质量分数)的 1×TBST 稀释液稀释 1000 倍], 抗 AMPK
20 172 位 Thr 磷酸化 (Phospho) 的抗体[用含 0.5% BSA(质量分数)的 1×TBST
稀释液稀释 1000 倍], 4℃ 过夜。一抗孵育结束后, 用 1×TBST 洗涤 PVDF
膜 3 次, 10 min/次后, 孵育 HRP 辣根过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 抗体用

-17-

含 0.5% BSA (质量分数) 的 1×TBST 稀释液稀释 2000 倍], 室温孵育 2 小时。二抗孵育结束后, 用 1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次, 然后加入 ECL 显影液, 用 Koda 凝胶成像系统显影。

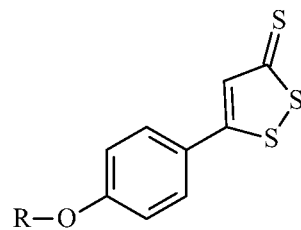
显影结果如图 1 所示, 其中, 图 1(a) 示 HSD 在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平; 图 1(b) 示 HSD-OH 在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平; 图 1(c) 示 HSD-3 在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平; 图 1(d) 示 HSD-4 在不加 LPS 刺激的巨噬细胞细胞中对 AMPK 的活化水平, P-AMPK 示 AMPK 活化水平。由图可知, 与加入溶剂的对照细胞相比 (0 min) 相比, 加入终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD[图 1(a)]、HSD-OH[图 1(b)]、HSD-3[图 1(c)]或 HSD-4[图 1(d)], 在各检测时间点 (30 min、60 min、120 min、240 min 或 480 min), 小鼠巨噬细胞 AMPK172Thr 磷酸化水平明显上升, 而总 AMPK 内标 β -actin 水平保持不变。由于 AMPK172Thr 磷酸化水平代表了 AMPK 激酶的活化水平, 所以这一结果表明, 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮在细胞模型上显著激活 AMPK。 β -actin 为内参, 表明总的检测蛋白量是相同的。

实施例 2 在 LPS 致炎条件下式 I 所示化合物对巨噬细胞 AMPK 的激活作用

将小鼠巨噬细胞系细胞由液氮罐中取出后迅速置于 37℃温水中轻轻摇晃解冻, 1000 转离心 3min, 弃上清, 细胞在 FBS 的质量分数为 10% 的 DMEM 培养基中培养, 当细胞在培养皿中覆盖率达 60%~70% 时进行传代培养。传代的细胞覆盖率达 60%~70% 后, 1000 转离心 3 min 获取细胞, 用台盼蓝染色, 用血球计数仪于显微镜下计数。将计数后的细胞稀释至浓度为 15 万/mL~20 万/mL, 进行铺 96 孔板, 1.5 万/孔~2.0 万/孔。

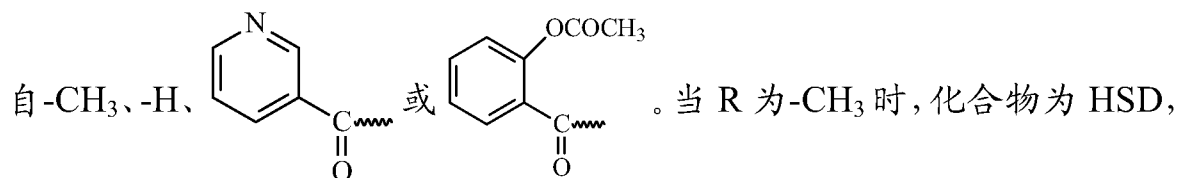
配制 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物溶液, 称取式 I 所示化合物, 以 DMSO 溶解, 使溶液的终浓度以质量浓度计为 100 mmol/L。

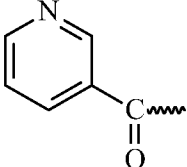
-18-

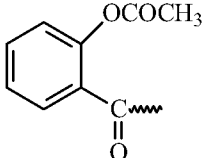


式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



5 当 R 为 -H 时, 化合物为 HSD-OH; 当 R 为  时, 化合物为 HSD-3;

当 R 为  时, 化合物为 HSD-4。

细胞培养 24 h 后, 分别加入 HSD 溶液、HSD-OH 溶液使在细胞中的终浓度为 50 μmol/L, 或加入二甲双胍使在细胞中的终浓度为 500 μmol/L 和 1000 μmol/L; 再同时加入 LPS 使其在细胞中的终浓度为 100 ng/mL,

10 并在对照组细胞中加入 DMSO 及生理盐水使其体积与对照组相等。在加药后 30 min、60 min、120 min、240 min 及 480 min 时, 取样并以 RIPA 裂解液提取细胞蛋白, 方法为: 加入 RIPA 裂解液 40 μL, 反复吹打细胞, 将吹打下来的细胞匀浆置于 500 μL 离心管中, 在冰上静置 30 min 以充分裂解细胞, 然后转移离心管至高速离心机, 在 4℃ 条件下, 13200 rpm 离

15 心 20 min~25 min, 吸取上清也 (含细胞蛋白质) 至另一个离心管中, 并储存于 -80℃ 冰箱。提取的细胞蛋白采用二喹啉甲酸 (BCA) 测蛋白浓度。

制备 SDS-聚乙丙烯蛋白电泳胶, 待凝胶聚合后, 每个加样孔加入 30 mg 细胞蛋白样品, 先以恒压 60 V 进行电泳。待蛋白分子量标记跑开后, 改用恒压 100 V。电泳结束后, 以恒流 350 mA 将 SDS-聚乙丙烯蛋白电泳

胶上的蛋白转移至 PVDF 纤维膜上, 持续转膜 115 min。转膜结束后, 取出 PVDF 膜, 用 5% 牛奶 (1×TBST 配制) 封闭液封闭 2 小时。封闭结束后, 用 1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次, 分别孵育 AMPK 抗体[用含 0.5% BSA (质量分数) 的 1×TBST 稀释液稀释 1000 倍], 抗 AMPK 172 5 位 Thr 磷酸化 (Phospho) 的抗体[用含 0.5% BSA (质量分数) 的 1×TBST 稀释液稀释 1000 倍], 4℃ 过夜。一抗孵育结束后, 用 1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次后, 孵育 HRP 辣根过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 抗体用含 0.5% BSA (质量分数) 的 1×TBST 稀释液稀释 2000 倍], 室温孵育 2 小时。二抗孵育结束后, 用 1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次, 然后加入 ECL 显影液, 用 Koda 凝胶成像系统显影。

显影结果如图 2 所示, 其中, 其中, 图 2 (a) 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症模型上终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 对 AMPK 的活化水平; 图 2 (b) 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD-OH 对 AMPK 的活化水平; 图 2 (c) 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上终浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的二甲双胍对 AMPK 的活化水平; 图 2 (d) 15 示 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上终浓度为 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的二甲双胍对 AMPK 的活化水平。由图可知, 其中, β -actin 为内参, 表明总的检测蛋白量是相同的, 仅以 LPS 处理细胞, 在不同的时间点 (30 min、60 min、120 min、240 min 或 480 min) AMPK 172Thr 磷酸化水平明显较低。与仅 20 加 LPS 的对照细胞相比, 同时加入 LPS 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 或 HSD-OH 的巨噬细胞的 AMPK 磷酸化 (P-AMPK) 水平在各个检测时间点均明显上升, 而总 AMPK 水平(AMPK)基本没有变化, 表明 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD 或 HSD-OH 在 LPS 的情况下也可激活 AMPK。结果表明: 在 LPS 刺激的巨噬细胞炎症细胞模型上, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSD[图 2(a)]和 HSD-OH[图 2(b)] 25 明显提高 AMPK 磷酸化 (活化) 水平。

如图 2 所示, LPS 刺激的巨噬细胞炎症模型上, 与仅加 LPS (终浓度为 100 ng/ml) 的对照细胞相比, 同时加入 LPS 和 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍的巨噬细胞的 AMPK 磷酸化 (P-AMPK) 水平明显上升, 而加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍的巨噬细胞的 AMPK 磷酸化 (P-AMPK) 水平无明显上

-20-

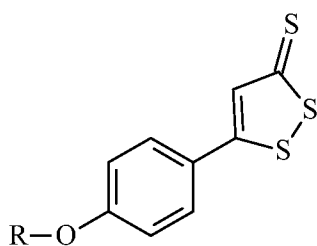
升。表明临床上抗糖尿病的一线药物、公认的 AMPK 激活剂二甲双胍在 500 $\mu\text{mol/L}$ 时并不能在 LPS 致炎条件下活化 AMPK[图 2(c)], 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的二甲双胍才能在 LPS 致炎条件下活化 AMPK[图 2(d)]。说明二甲双胍激活 AMPK 的作用明显弱于 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物。

- 5 本实施例仅检测了 HSD-OH 和 HSD 在 LPS 致炎条件下对巨噬细胞 AMPK 的激活作用, 结果表明 HSD-OH 和 HSD 在 LPS 的情况下也可激活 AMPK 且效果强于二甲双胍。由于 HSD-OH 与 HSD、HSD-3、HSD-4 具有相同的药效基团, 且本发明实施例 1 提供的数据表明 HSD、HSD-3 及 HSD-4 和 HSD-OH 具有相同的药理作用, 均能激活 AMPK。故可以推
- 10 理 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物在 LPS 的情况下皆可激活 AMPK, 其实验结果在此不作赘述。

实施例 3 式 I 所示化合物对人源细胞 KEK293T AMPK 的激活作用

- 15 将 KEK293T 细胞由液氮罐中取出后迅速置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温水中轻轻摇晃解冻, 1000 转离心 3 min, 弃除上清, 细胞在 FBS 的质量分数为 10% 的 DMEM 培养基中培养, 细胞在培养皿中覆盖率达 60%~70% 时进行传代培养。传代的细胞覆盖率达 60%~70% 后, 1000 转离心 3 min 获取细胞, 用台盼蓝染色, 用血球计数仪于显微镜下计数 15 万/mL~20 万/mL, 进行铺
- 20 96 孔板, 1.5 万/孔~2.0 万/孔。

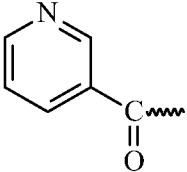
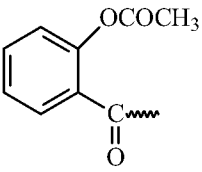
- 20 配制 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物溶液, 称取式 I 所示化合物, 以 DMSO 溶解, 使溶液的终浓度以质量浓度计为 50 mmol/L。

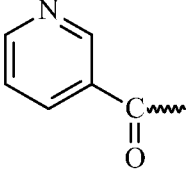


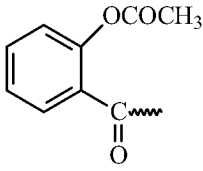
式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选

-21-

自-CH₃、-H、 或 。当 R 为-CH₃ 时, 化合物为 HSD,

当 R 为-H 时, 化合物为 HSD-OH; 当 R 为  时, 化合物为 HSD-3;

当 R 为  时, 化合物为 HSD-4。

细胞培养 24 h 后, 加入 HSD-OH 溶液使在细胞中的终浓度为 50
5 $\mu\text{mol/L}$, 以只加入等体积的 DMSO 的细胞为对照。细胞在培养箱中继续
培养, 在加药后 30 min、60 min、120 min、240 min、480 min 时, 取样
并以 RIPA 裂解液提取细胞蛋白, 方法为: 加入 RIPA 裂解液 40 μL , 反
复吹打细胞, 将吹打下来的细胞匀浆置于 500 μL 离心管中, 冰上静置 30
min 以充分裂解细胞, 然后转移离心管至高速离心机, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 13200
10 rpm, 20min~25min, 吸取上清 (含细胞蛋白质) 至另一个离心管中, 并
储存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。提取的细胞蛋白采用二喹啉甲酸 (BCA) 测蛋白浓度。

制备 SDS-聚乙丙烯蛋白电泳胶, 待凝胶聚合后, 每个加样孔加入 30
mg 细胞蛋白样品, 先以恒压 60 V 进行电泳。待蛋白分子量标记跑开后,
改用恒压 100 V。电泳结束后, 以恒流 350 mA 将 SDS-聚乙丙烯蛋白电泳
15 胶上的蛋白转移至 PVDF 纤维膜上, 持续转膜 115 min。转膜结束后, 取
出 PVDF 膜, 用 5% 牛奶 (1 $\times$ TBST 配制) 封闭液封闭 2 小时。封闭结束
后, 用 1 $\times$ TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次, 分别孵育 AMPK 抗体[用
含 0.5% BSA (质量分数) 的 1 $\times$ TBST 稀释液稀释 1000 倍], 抗 AMPK 172
位 Thr 磷酸化 (Phospho) 的抗体[用含 0.5% BSA (质量分数) 的 1 $\times$ TBST
20 稀释液稀释 1000 倍], 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。一抗孵育结束后, 用 1 $\times$ TBST 洗涤 PVDF
膜 3 次, 10 min/次后, 孵育 HRP 辣根过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 抗体用
含 0.5% BSA (质量分数) 的 1 $\times$ TBST 稀释液稀释 2000 倍], 室温孵育 2

-22-

小时。二抗孵育结束后，用 1×TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次，10 min/次，然后加入 ECL 显影液，用 Koda 凝胶成像系统显影。

显影结果如图 3 所示：其中， β -actin 为内参，表明总的检测蛋白量是相同的。与加入溶剂的对照细胞相比，加入终浓度为 50 μ mol/L HSD-OH 的巨噬细胞在检测时间点（30 min、60 min、120 min、240 min、480min）AMPK 磷酸化（P-AMPK）水平明显上升，而总 AMPK 水平（AMPK）基本没有变化。表明 HSD-OH 可激活人源 AMPK。结合实施例 1~2，表明 HSD-OH 对 AMPK 的激活作用没有种属特异性。

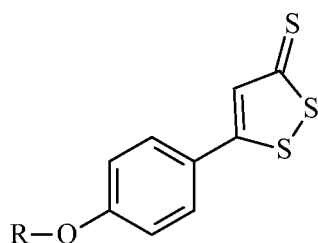
本实施例仅检测了 HSD-OH 对人源细胞 KEK293T 中 AMPK 的激活作用，结果表明 HSD-OH 可激活人源 AMPK。由于 HSD-OH 与 HSD、HSD-3、HSD-4 具有相同的药效基团，且本发明实施例 1 提供的数据表明 HSD、HSD-3、HSD-4 和 HSD-OH 均能激活 AMPK，故可以推理可以推理 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物对人源 AMPK 有激活作用，其实验结果在此不作赘述。

实施例 4 式 I 所示化合物在 STZ 诱导的 ICR 小鼠糖尿病模型中的降糖作用

将购买回的 ICR 小鼠放于动物房中适应环境 24 小时，移去食物，仅供水，15 小时后腹腔注射 STZ，注射量根据小鼠体重而定，为 90 mg/kg，同时恢复供食，诱导小鼠 II 型糖尿病。

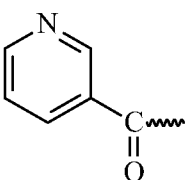
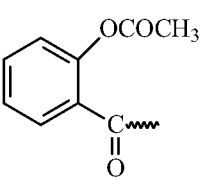
将注射 STZ 后的小鼠随机分成 2 组，分别为溶剂注射组和 HSD 给药组，每组随机取 7 只小鼠。其中溶剂注射组仅注射溶解 HSD 的溶剂，HSD 给药组小鼠注射配制好的 HSD 溶液，给药量为 50 mg/kg/天（每天每千克动物体重给药 50 mg）。给予 STZ 6 小时后，按照分组分别给药，总计 4 周。HSD 溶液的配制方法为：12 mg 的 HSD 首先以 80 μ L DMSO 溶解，再以 920 μ L 玉米油稀释成终浓度为 12 mg/mL 的溶液，即得。

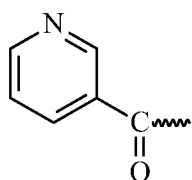
—23—

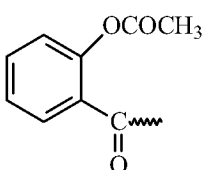


式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选

自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{H}$ 、 或 。当 R 为 $-\text{CH}_3$ 时, 化合物为 HSD,

5 当 R 为 $-\text{H}$ 时, 化合物为 HSD-OH; 当 R 为  时, 化合物为 HSD-3;

当 R 为  时, 化合物为 HSD-4。

在注射 HSD 溶液后的第 3 天、7 天、14 天、21 天和 28 天测定小鼠的空腹血糖。方法如下: 测血糖的前一天晚上将小鼠的食物移去, 仅供水, 15 小时后, 将小鼠用小鼠固定器固定 (避开小鼠笼子, 以免其他小鼠因受惊吓血糖升高), 用采血针刺破尾部, 至出血 10 微升左右, 然后将血滴在已插在血糖仪上的试纸上, 5 秒后记录度数。

注射 HSD 溶液 28 天后测定非空腹血糖, 测血糖前一天晚上不移去食物, 正常供水, 进行血糖测定, 其他方法同空腹血糖的测定。

血糖测试结果如图 4(a)和图 4(b)所示, 其中, 图 4(a)示注射 HSD 溶液 28 天后小鼠的非空腹血糖测定结果, 图 4(b)示注射 HSD 溶液后的第 3 天、7 天、14 天、21 天和 28 天小鼠的空腹血糖测定结果。结果表明, 与溶剂对照组小鼠相比, HSD 在注射后 28 天显著降低 II 型糖尿病小鼠的非空腹血糖[图 4(a)]; 在注射后 3 天、7 天、14 天、21 天和 28 天测定空腹

-24-

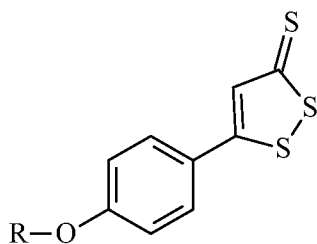
血糖。HSD 注射后 14 天和 28 天显著降低 II 型糖尿病小鼠的空腹血糖[图 4(b)]。其中，*表示在 $p < 0.05$ 水平下有显著性差异。

本实施例仅检测了 HSD 对低剂量 STZ 诱导的 II 型糖尿病 ICR 小鼠的降糖作用,结果表明 HSD 可有效降低 STZ 诱导的 II 型糖尿病小鼠的血糖。由于 HSD 与 HSD-OH、HSD-3、HSD-4 具有相同的药效基团,且本
5 发明实施例 1 和本发明实施例 2 提供的数据表明 HSD 和 HSD-OH、HSD-3 及 HSD-4 具有相同的药理作用:即均能激活 AMPK,而 AMPK 激活正是糖尿病药物降糖的关键作用机制。因此,可以推理 3H-1,2-二硫环戊烯-3-
10 硫酮类化合物对在 STZ 诱导的 ICR 小鼠 II 型糖尿病模型中具有降糖作用,其实验结果在此不作赘述。

实施例 5 式 I 所示化合物对 STZ 诱导的糖尿病小鼠的脑缺血(大脑中动脉堵塞)保护作用

将购买回的 ICR 小鼠放于动物房中适应环境 24 小时,移去食物,仅
15 供水,15 小时后腹腔注射 STZ,注射量根据小鼠体重而定,为 90 mg/kg,同时恢复供食,诱导小鼠 II 型糖尿病。

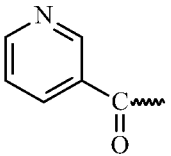
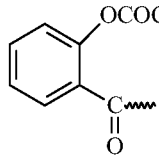
将注射 STZ 后的小鼠随机分成 2 组,分别为溶剂注射组和 HSD 给药组,每组随机取 7 只小鼠。其中溶剂注射组仅注射溶解 HSD 的溶剂;HSD 给药组小鼠注射配制好的 HSD 溶液,给药量为 50 mg/kg/天(每天每千克
20 动物体重给药 50 mg)。给予 STZ 6 小时后,按照分组分别给药,总计 4 周。4 周后对这些小鼠行大脑中动脉栓塞手术。

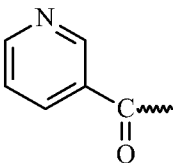


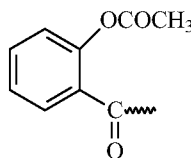
式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物,其中,R 选

-25-

自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{H}$ 、 或 。当 R 为 $-\text{CH}_3$ 时, 化合物为 HSD,

当 R 为 $-\text{H}$ 时, 化合物为 HSD-OH; 当 R 为  时, 化合物为 HSD-3;

当 R 为  时, 化合物为 HSD-4。

HSD 溶液的配制方法为: 取 12 mg 的 HSD 首先以 80 μL DMSO 溶解,
5 再以 920 μL 玉米油稀释成终浓度为 12 mg/mL 的溶液, 即得。

参照 Longa 法及其他改良线栓法制作小鼠右侧大脑中动脉栓(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。操作步骤为: 小鼠以异氟烷麻醉后。麻醉小鼠仰位固定, 常规碘酒消毒颈部皮肤及头部皮肤。将激光多普勒脑血流测定探头固定于小鼠右侧耳眼连线的中点处, 以实时监测大脑皮
10 层血流。在颈部正中作约 1.5 cm 切口, 暴露右侧颈动脉三角, 在手术显微镜下逐层分离组织, 首先分离出颈总动脉, 用微型血管夹在近动脉分叉处临时夹闭颈总动脉, 再分离右侧颈外动脉和颈内动脉, 分离颈外动脉主干, 结扎颈外动脉的分枝枕动脉、甲状腺上动脉和咽升动脉, 在其远端
15 0.5 cm 处用 5-0 缝线结扎颈外动脉。同时用微型血管夹临时夹闭颈内动脉, 不打开颈动脉鞘, 不分离和结扎翼腭动脉。并在颈总动脉分叉口与颈外动脉远端结扎线之间结扎一道缝合线, 不打紧, 随后用眼科剪在颈外动脉远端结扎线内侧剪一小口, 用显微镊持住栓线(采用加热法使头端稍微膨大, 再包被硅胶、酒精消毒, 栓线长度约为 2cm, 线头直径 $0.22 \pm 0.01 \text{ cm}$)。由
20 颈外动脉切口进线, 提拉颈外动脉远端结扎线, 至栓线头端进入颈总动脉分叉口后, 扎紧缝合线。再由颈外动脉切口处剪断颈外动脉, 并松开颈内动脉血管夹, 轻轻牵拉颈外动脉残端以增大它于颈内动脉的夹角, 缓缓推进栓线使之由颈外动脉通过分叉处进入颈内动脉, 直至有轻微阻力、并在

激光多普勒脑血流测定仪上观察到大脑皮层血流突然急剧下降(血流应下降到基值的 25%以下),表明栓线头部已抵达大脑中动脉的起始部为,阻断大脑中动脉的血流。记录栓塞开始时间,将颈外动脉上缝合线扎紧,并松开颈总动脉血管夹,再次消毒,缝合切口皮肤。中动脉堵塞 60min 后, 5 拔出栓线,恢复大脑中动脉血供进行再灌注。术中和术后用电热板保持肛温在 $(37.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 范围内,直至动物苏醒。

小鼠大脑中动脉堵塞(MCAO)再灌注 24h 后,计数动物死亡率。对存活小鼠麻醉后迅速断头取脑,脑组织剥取后去除嗅球、小脑和低位脑干,间隔 1 mm 连续做 5 个脑冠状切片,置于体积分数为 2%的 TTC 溶液中, 10 37°C 避光温浴,每隔 15 min 翻面一次,共温浴 30 min。以 TTC 染色法测定脑梗死区域大小。TTC 被线粒体过氧化氢酶还原,可使正常脑组织染色呈红色,而缺血梗死组织则呈白色。染色后用 4%多聚甲醛溶液固定 24h,数码相机拍照,用软件分析计算梗死体积百分比,结果表示为缺血侧梗死体积与对侧脑体积的比值。所有数据均采用均值 $\pm$ 标准差(SD) 15 来表示。各组间差异比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 认为统计学上有显著性差异。

统计结果如图 5 所示,其中,图 5(a)示脑梗死体积的统计结果表明,对低剂量 STZ (90 mg/kg) 诱导的 ICR 小鼠非胰岛素依赖性(II 型)糖尿病小鼠注射 HSD 28 天 (50mg/kg/天),大脑中动脉堵塞 24 小时后,与仅注射溶剂对照组的 II 型糖尿病小鼠相比,注射 50mg/kg HSD 显著降低皮 20 层、纹状体及大脑半球梗死体积,表明 HSD 对 II 型糖尿病的并发症脑缺血具有显著的保护作用。

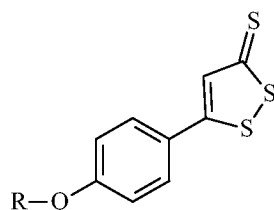
图 5(b)示大脑中动脉阻塞后 II 型糖尿病小鼠的死亡率。结果表明:低剂量 STZ (90 mg/kg) 诱导 ICR 小鼠非胰岛素依赖性(II 型)糖尿病后,对小鼠注射 HSD(50 mg/kg/天),4 周后行大脑中动脉阻塞,HSD 注射(50 25 mg/kg/天)可降低 II 型糖尿病小鼠的死亡率。

本实施例仅检测了 HSD 对 STZ 诱导的糖尿病小鼠的脑缺血保护作用,结果表明 HSD 对 II 型糖尿病的并发症脑缺血具有显著的保护作用且可有效降低大脑中动脉阻塞后 II 型糖尿病小鼠的死亡率。由于 HSD 与 HSD-OH、HSD-3、HSD-4 具有相同的药效基团,且本发明实施例 1 和本

-27-

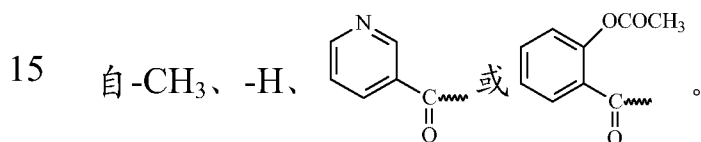
发明实施例 2 提供的数据表明 HSD、HSD-3 及 HSD-4 和 HSD-OH 具有相同的药理作用，即均能激活 AMPK。AMPK 激活是糖尿病药物降糖的关键作用机制，而降低血糖也是治疗和预防糖尿病及其并发症的关键措施。另外，AMPK 激活还是抑制炎症细胞过度激活的关键机制，而炎症细胞的过度激活也是导致并发症的重要因素。因此，可以推理 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物对糖尿病小鼠的脑缺血（大脑中动脉堵塞）保护作用以及对其它糖尿病并发症的治疗和预防作用，其实验结果在此不作赘述。

10 实施例 6 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的片剂



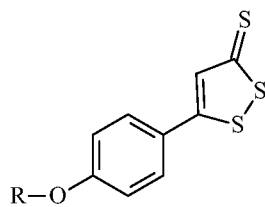
式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，其中，R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得片剂。

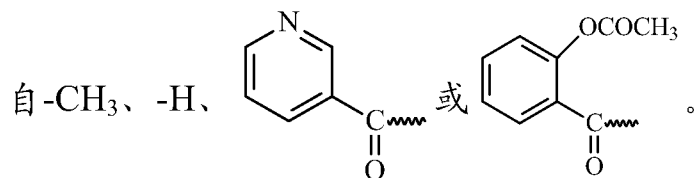
20 实施例 7 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的胶囊剂



式I

-28-

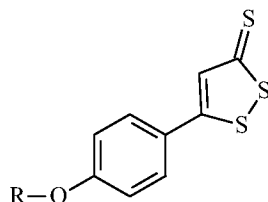
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得胶囊剂。

5

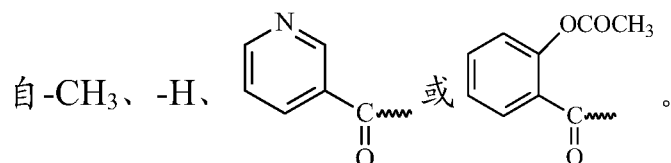
实施例 8 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的微囊剂



式I

10

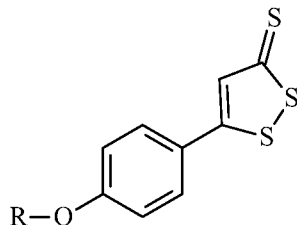
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得微囊剂。

15

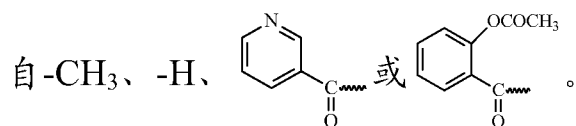
实施例 9 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的颗粒剂



式I

-29-

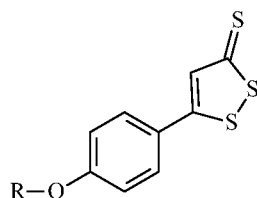
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得颗粒剂。

5

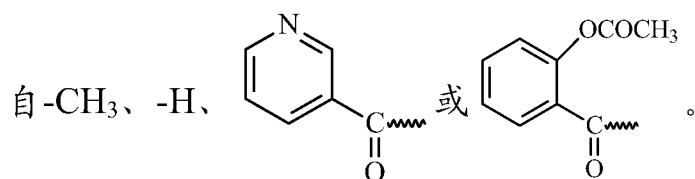
实施例 10 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发病的分散粉末



式I

10

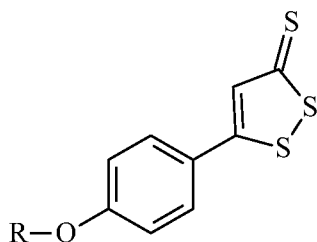
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得分散粉末。

15

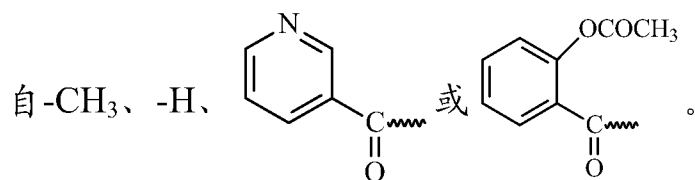
实施例 11 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发病的注射液



式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选

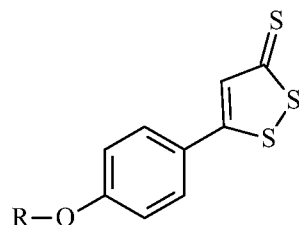
—30—



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得注射液。

5

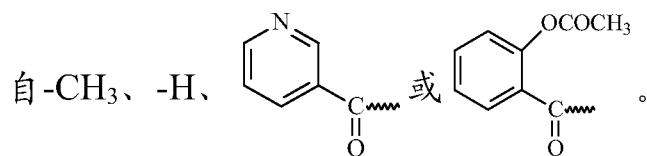
实施例 12 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的脂质体



式I

10

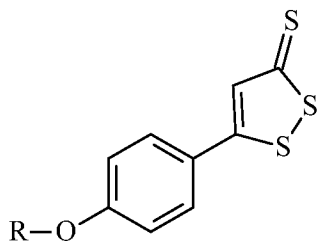
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，其中，R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得脂质体。

15

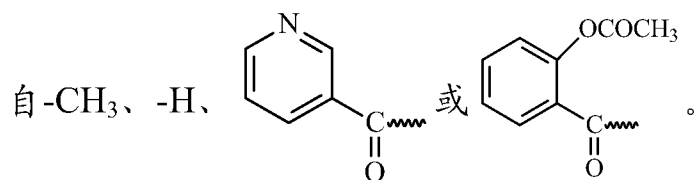
实施例 13 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的口服液



式I

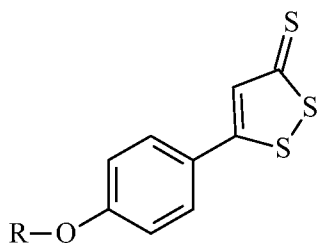
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，其中，R 选

-31-



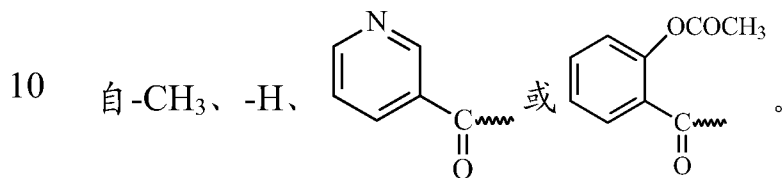
取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得口服液。

5 实施例 14 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发的丸剂



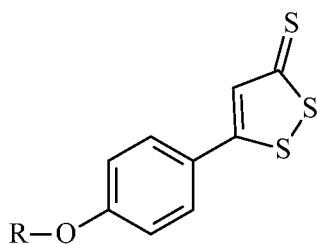
式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得丸剂。

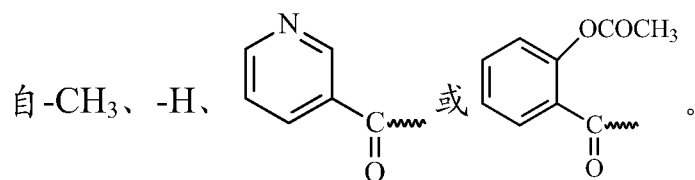
15 实施例 15 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发的汤剂



式I

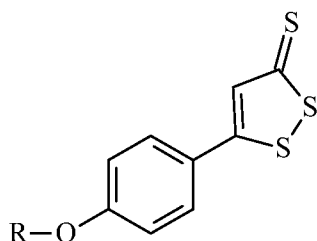
-32-

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



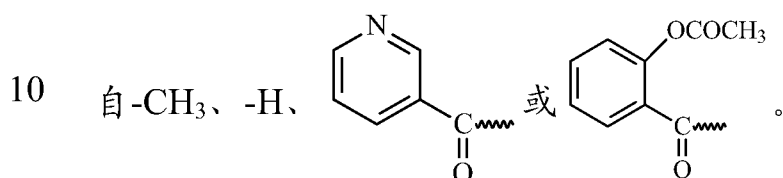
取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得汤剂。

5 实施例 16 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的膏剂



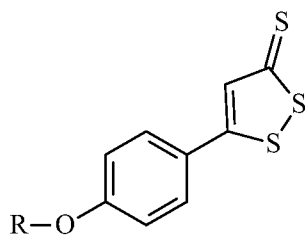
式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料, 采用常规方法制得膏剂。

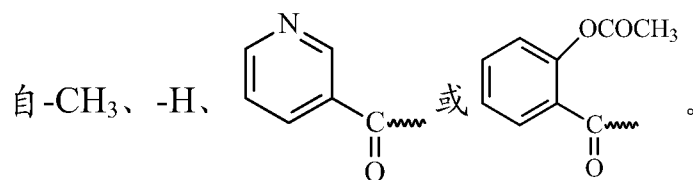
15 实施例 17 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的露剂



式I

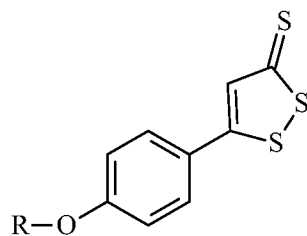
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物, 其中, R 选

—33—



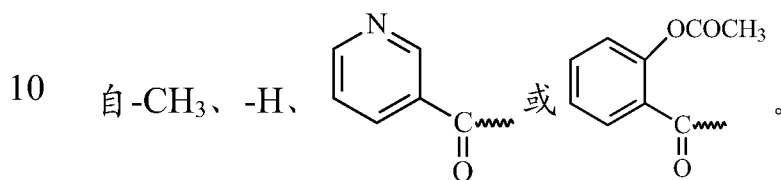
取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得露剂。

5 实施例 18 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的滴丸剂



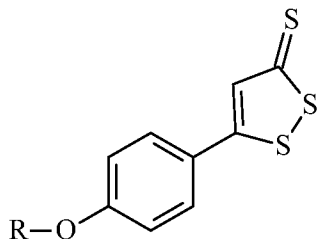
式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，其中，R 选



取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得滴丸剂。

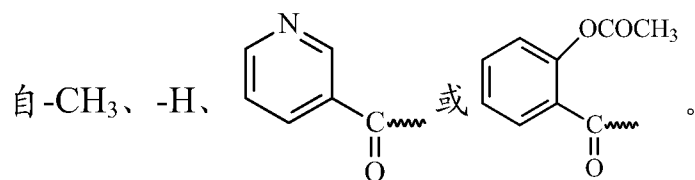
15 实施例 19 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的粉针剂



式I

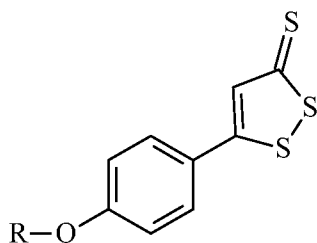
式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，其中，R 选

—34—



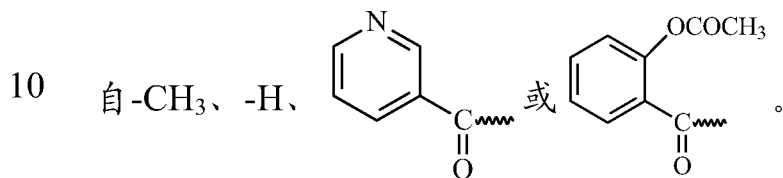
取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得粉针剂。

5 实施例 20 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的栓剂



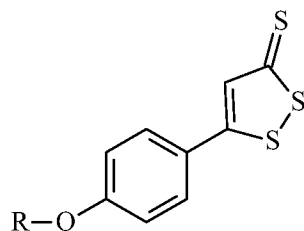
式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，其中，R 选



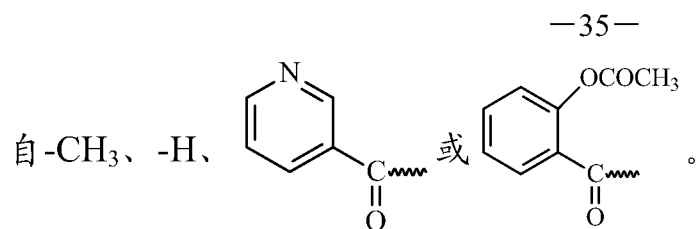
取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得栓剂。

15 实施例 21 式 I 所示化合物用于制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的吸入剂



式I

式 I 所示化合物为 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物，其中，R 选



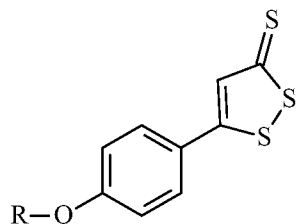
取 3H-1,2-二硫环戊烯-3-硫酮类化合物添加常规辅料，采用常规方法制得吸入剂。

- 5 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

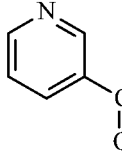
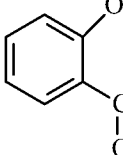
-36-

权 利 要 求

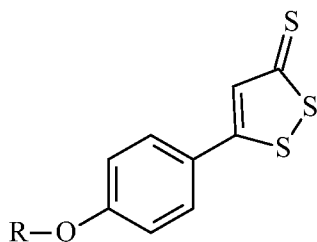
1、具有式 I 所示结构的化合物作为 AMPK 激活剂的应用



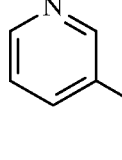
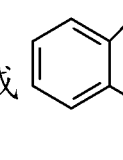
式I

其中，R 选自 -CH₃、-H、 或 。

2、具有式 I 所示结构的化合物在制备治疗和/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物中的应用



式I

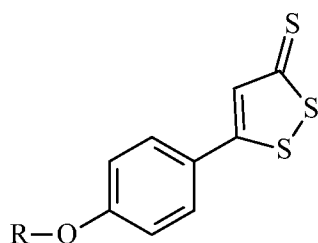
其中，R 选自 -CH₃、-H、 或 。

3、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述糖尿病为 II 型糖尿病。

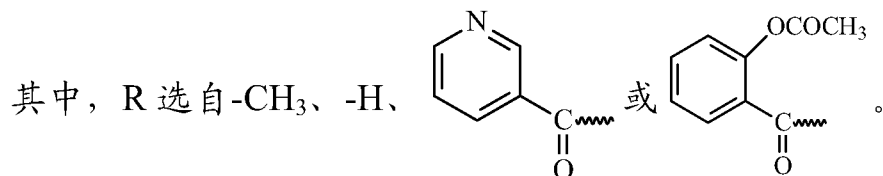
4、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述糖尿病并发症包括高血压、心脑血管疾病、肥胖、神经病、视网膜疾病、糖尿病肾病或多囊性卵巢综合症。

5、一种用于治疗 and/或预防糖尿病和/或糖尿病并发症的药物，其特征在于，包括如式 I 所示结构的化合物和药学上可接受的辅料

-37-



式I



6、根据权利要求 5 所述的药物，其特征在于，所述药物中所述具有式 I 所示结构化合物的质量分数为 0.05%~99%。

7、根据权利要求 5 所述的药物，其特征在于，所述药物的给药方式为局部给药、消化道给药或非消化道给药。

8、根据权利要求 5 所述的药物，其特征在于，所述药物的剂型包括口服制剂、注射剂、栓剂或吸入剂。

10 9、根据权利要求 8 所述的药物，其特征在于，所述口服制剂为胶囊剂、微囊剂、丸剂、片剂、汤剂、颗粒剂、膏剂、分散粉末、露剂、口服液、滴丸剂、脂质体。

10、根据权利要求 8 所述的药物，其特征在于，所述注射剂为粉针剂或注射液。

-1/4-

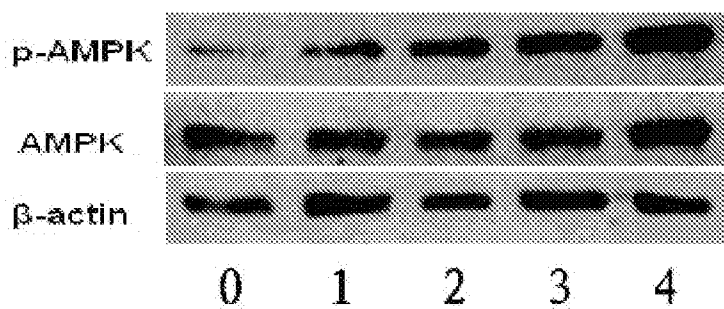
说明书附图

图 1(a)

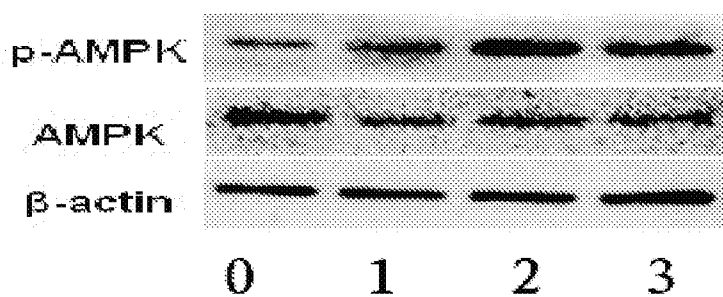


图 1(b)

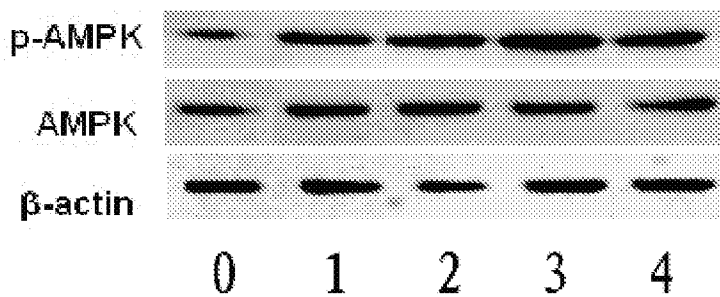


图 1(c)

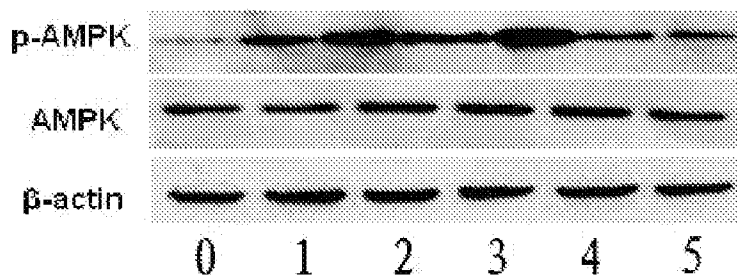


图 1(d)

图 1

—2/4—

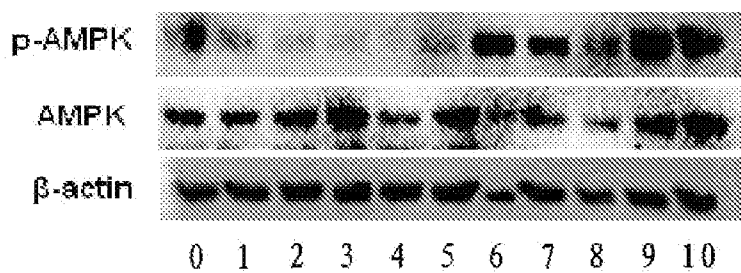


图 2(a)

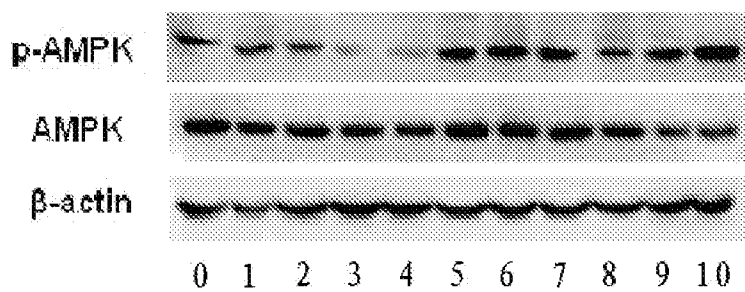


图 2(b)

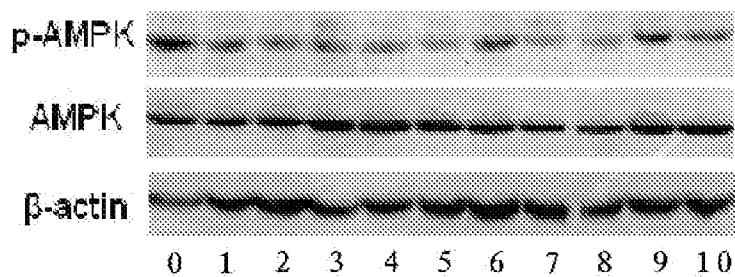


图 2(c)

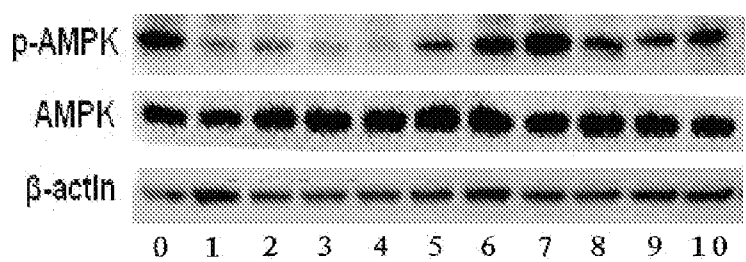


图 2(d)

图 2

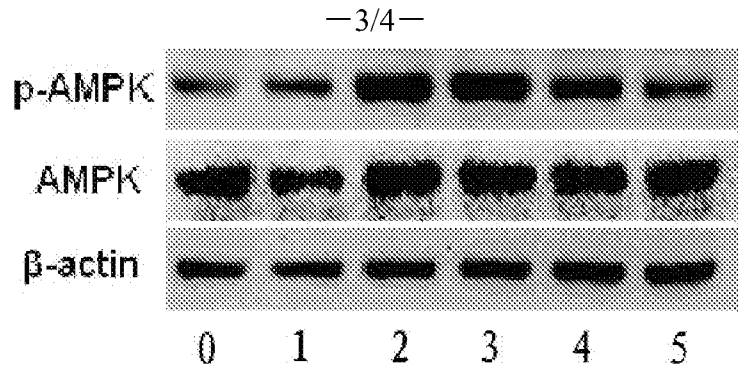


图 3

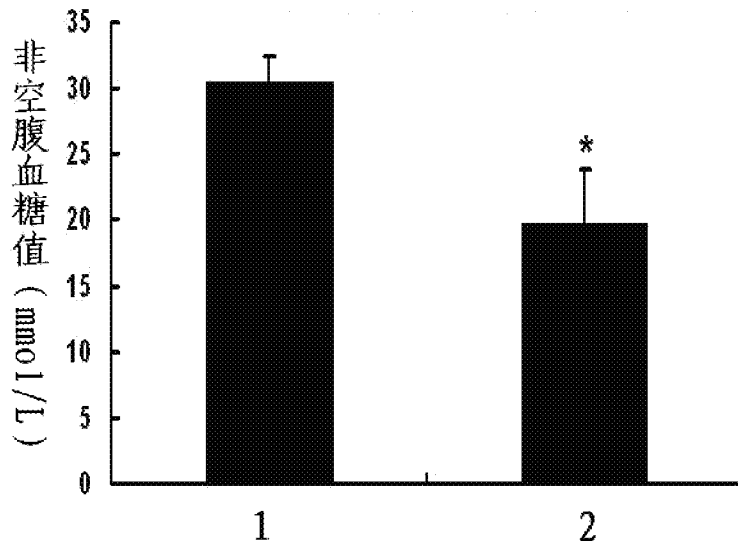


图 4(a)

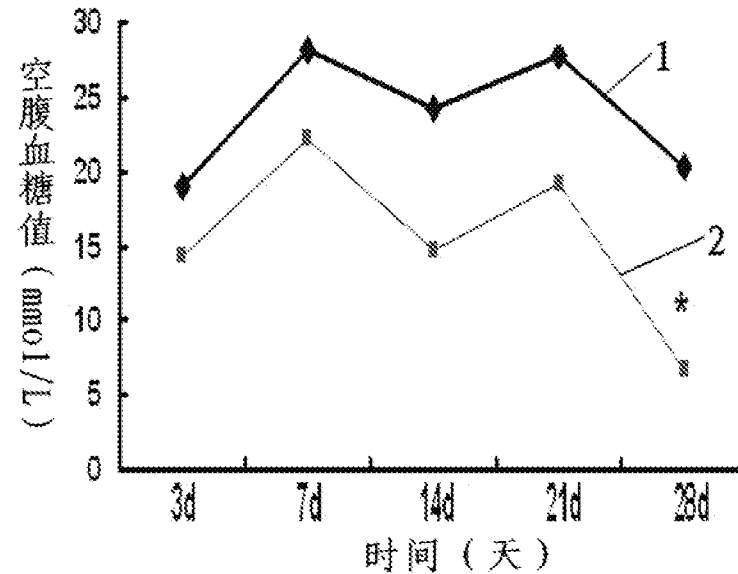


图 4(b)

图 4

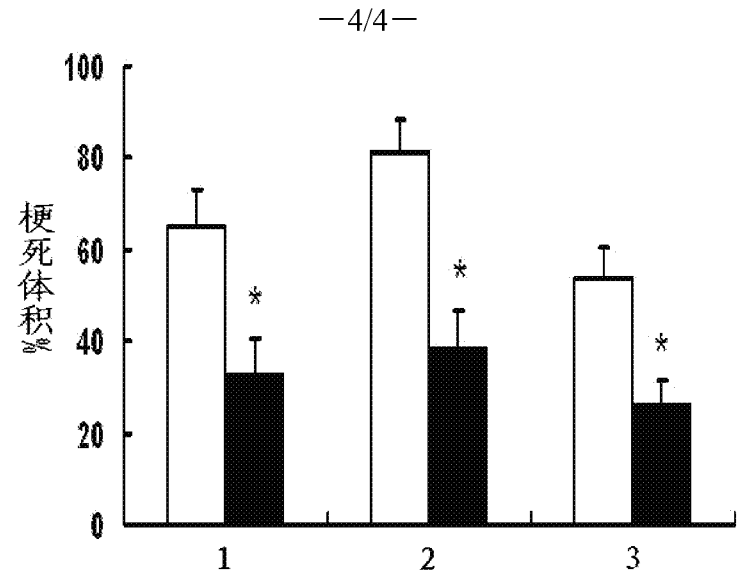


图 5(a)

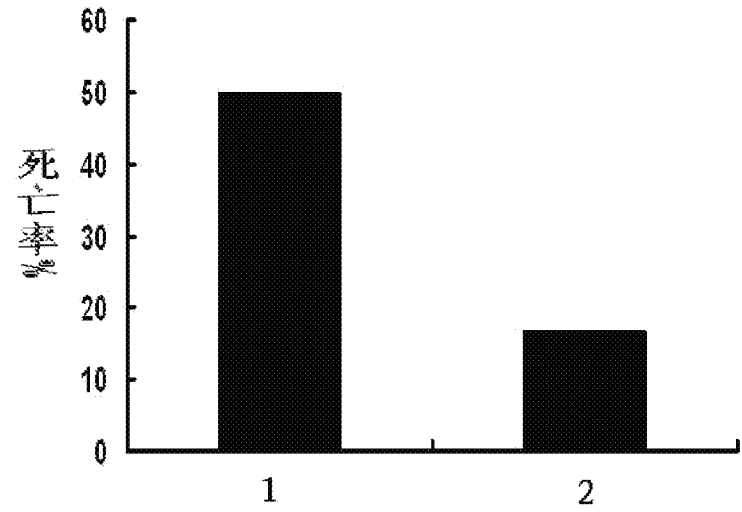


图 5(b)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/070166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT (CN), CNKI (CN), China Pharmaceutical Abstracts (CN), Medline, CHEMICAL ABSTRACTS (US), EMBASE, STN: AMPK, AMP, retinal, amp, activated protein kinase, diabetes, obesity, hypertension, cardiovascular, cerebrovascular, neuropathy, retinal disease?, diabetic nephropathy, polycystic ovary syndrome, structure search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006066894 A1 (METABONO S.A.), 29 June 2006 (29.06.2006), description, page 2, line 8 to page 3, line 21, page 9, line 14 to page 10, line 12, and page 11, line 14 to page 12, line 20	2-10
Y		1
Y	GE, Bin et al., AMPK acts as a new target for the treatment of type 2 diabetes, CHINESE PHARMACOLOGICAL BULLETIN, 24(5), 31 May 2008 (31.05.2008), pages 580-583	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 28 August 2013 (28.08.2013)	Date of mailing of the international search report 19 September 2013 (19.09.2013)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XIU, Wen Telephone No.: (86-10) 62411205

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/070166

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claim No.: 1

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 1 relates to an application of the compound of formula I as an AMPK activator, comprising the contents that the compound of formula I is used for the treatment of diseases related to AMPK activation, namely the scope of protection of claim 1 comprises a method of treatment of diseases by therapy, which is a subject matter not warranting a search (PCT Rule 39.1(iv)), but an international search has been carried out with regarding to the use of the compound of formula I abovementioned in the preparation of AMPK activator.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/070166

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2006066894 A1	29.06.2006	EP 1836160 A1	26.09.2007
		US 2009036516 A1	05.02.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/070166

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

A61K 31/385 (2006.01) i

A61K 31/4436 (2006.01) i

A61K 9/02 (2006.01) i

A61K 9/06 (2006.01) i

A61K 9/08 (2006.01) i

A61K 9/127 (2006.01) i

A61K 9/14 (2006.01) i

A61K 9/19 (2006.01) i

A61K 9/20 (2006.01) i

A61K 9/48 (2006.01) i

A61K 9/50 (2006.01) i

A61K 9/72 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) i

A61P 9/12 (2006.01) i

A61P 9/00 (2006.01) i

A61P 3/04 (2006.01) i

A61P 25/00 (2006.01) i

A61P 9/10 (2006.01) i

A61P 13/12 (2006.01) i

A61P 15/00 (2006.01) i

A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI,EPODOC,CNPAT(CN), CNKI(CN), 中国药学文摘库(CN), Medline, CHEMICAL ABSTRACTS (US), EMBASE, STN: AMPK, AMP, 激活蛋白性激酶, 激活蛋白激酶, 糖尿病, 高血压, 心脑血管, 肥胖, 神经病, 视网膜, 糖尿病肾病, 多囊性卵巢综合症, amp activated protein kinase, diabetes, obesity, hypertension, cardiovascular, cerebrovascular, neuropathy, retinal disease?, diabetic nephropathy, polycystic ovary syndrome, 结构式检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2006066894 A1 (METABONO S.A.) 29.6 月 2006(29.06.2006) 说明书第 2 页第 8 行至第 3 页第 21 行, 第 9 页第 14 行至第 10 页第 12 行, 第 11 页第 14 行至第 12 页第 20 行	2-10
Y		1
Y	葛斌等, AMPK 作为治疗 2 型糖尿病新靶点的研究进展, 中国药理学通报, 24(5), 31.5 月 2008(31.05.2008), 第 580-583 页	1
☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 28.8 月 2013(28.08.2013)		国际检索报告邮寄日期 19.9 月 2013 (19.09.2013)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 修文 电话号码: (86-10) 62411205

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：1
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求1涉及式I化合物作为AMPK激活剂的应用，其中包括了将式I化合物用于治疗与AMPK激活有关的疾病的内容，即权利要求1的保护范围包括了疾病的治疗方法，属于不要求检索的主题(PCT细则39.1(iv))，但还是针对上述式I化合物在制备AMPK激活剂中的应用进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

关于同族专利的信息

PCT/CN2013/070166

26.09.2007
05.02.2009

主题的分类:

A61K31/385 (2006.01) i

A61K31/4436 (2006.01) i

A61K9/02 (2006.01) i

A61K9/06 (2006.01) i

A61K9/08 (2006.01) i

A61K9/127 (2006.01) i

A61K9/14 (2006.01) i

A61K9/19 (2006.01) i

A61K9/20 (2006.01) i

A61K9/48 (2006.01) i

A61K9/50 (2006.01) i

A61K9/72 (2006.01) i

A61P3/10 (2006.01) i

A61P9/12 (2006.01) i

A61P9/00 (2006.01) i

A61P3/04 (2006.01) i

A61P25/00 (2006.01) i

A61P9/10 (2006.01) i

A61P13/12 (2006.01) i

A61P15/00 (2006.01) i