(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 116669575 B
(45)授权公告日 2025.04.04

(21)申请号 202180076726.1
(22)申请日 2021.09.17
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116669575 A
(43)申请公布日 2023.08.29
(30)优先权数据
10-2020-0122540 2020.09.22 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.05.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2021/012823 2021.09.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/065831 KO 2022.03.31

(73)专利权人 庆北大学校产学协力团
地址 韩国大邱
(72)发明人 裵宰晟 陈喜庆 朴敏喜
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 左路

(51)Int.Cl.
A61K 31/4192(2006.01)
C07D 249/04(2006.01)
A23L 33/10(2006.01)

(56)对比文件
CN 112351974 A,2021.02.09
WO 2019212196 A1,2019.11.07

审查员 汤艳星

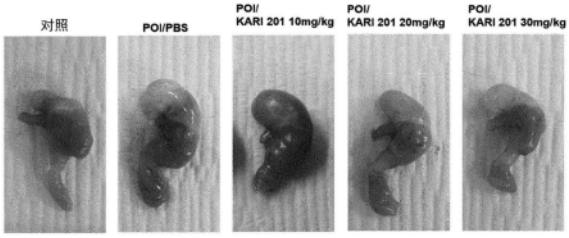
权利要求书1页 说明书17页 附图18页

(54)发明名称

作为胃促生长素受体激动剂的三唑化合物的用途

(57)摘要

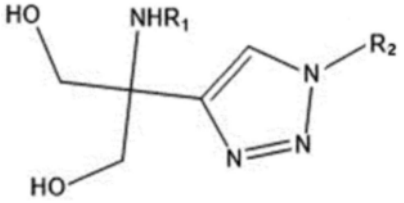
本发明涉及作为胃促生长素受体激动剂的三唑化合物的用途,更具体地,涉及用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的组合物,所述组合物含有以极高的特异性与胃促生长素受体强结合的三唑化合物。本发明提供的化合物表现出对胃促生长素受体以极高的特异性的强的结合力,因此可以非常有效地用于预防或开发由胃促生长素受体介导的疾病的治疗剂。



CN 116669575 B

1.下式1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物中的用途:

[式1]



其中

R_1是氢;或者具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;并且

R_2是氢;或者具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;

其中所述由胃促生长素受体介导的疾病选自:进食障碍;癌症厌食症或恶病质;抗癌药引起的恶病质或厌食症;抗癌药引起的痛觉过敏;慢性阻塞性肺疾病(COPD)或COPD恶病质;少肌症;体重减轻;癌症患者术后全身无力;慢性呼吸道感染;炎症;炎性肠病(IBD);功能性消化不良(FD);便秘;糖尿病性胃轻瘫;心力衰竭;心肌梗塞;糖尿病性神经病变;生长激素缺乏;患有脊髓损伤的患者的排便障碍;术后肠梗阻;和吗啡诱导的肠阻塞。

2.根据权利要求1所述的用途,其中R_1是氢。

3.根据权利要求1所述的用途,其中R_2是具有1至15个碳原子的直链或支链烷基。

4.根据权利要求1所述的用途,其中所述式1的化合物是2-氨基-2-(1-己基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-庚基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-辛基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-壬基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-十一烷基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇或2-氨基-2-(1-十二烷基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述式1的化合物是胃促生长素受体激动剂。

作为胃促生长素受体激动剂的三唑化合物的用途

技术领域

[0001] 本申请要求于2020年9月22日提交的韩国专利申请第2020-0122540号的优先权,其全部说明书通过引用并入本文。

[0002] 本发明涉及三唑化合物作为胃促生长素(ghrelin)受体激动剂的用途,更具体地,涉及用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的组合物,所述组合物含有以非常高的特异性与胃促生长素受体强结合的三唑化合物。

背景技术

[0003] 胃促生长素是生长激素(GH)促分泌素受体的内源性配体。最初从胃中纯化的胃促生长素是一种28个氨基酸肽类激素,其中3位的丝氨酸被正辛酰化。由于胃促生长素具有潜在的GH释放作用,因此认为它在维持GH释放和能量内稳态方面发挥重要作用(参见非专利文献1)。特别地,胃促生长素似乎具有潜在的增强食欲的作用。此外,已知胃促生长素激动剂可用于治疗和/或预防癌症厌食症/恶病质(参见非专利文献2、3和4)、抗癌药引起的恶病质和厌食症(参见非专利文献4和5)、抗癌药引起的痛觉过敏(参见非专利文献5)、COPD/COPD恶病质(参见非专利文献6和7)、少肌症(参见非专利文献8)以及进食障碍和神经源性进食障碍(参见非专利文献9);抑制体重减轻(参见非专利文献10);治疗和/或预防癌症患者术后全身无力(参见非专利文献11)、慢性呼吸道感染(参见非专利文献7),炎症(参见非专利文献12)、IBD(参见非专利文献12)、FD(参见非专利文献4)、便秘(参见非专利文献9)、糖尿病性胃轻瘫和胃轻瘫(参见非专利文献4和13)、心力衰竭(参见非专利文献14、15和16)、心肌梗塞(参见非专利文献14、15和16)、以及糖尿病性神经病变(参见非专利文献17);生长激素缺乏症的诊断和治疗(参见非专利文献18);提高老年人的生活质量(参见非专利文献18);以及治疗和/或预防患有脊髓损伤的患者的排便障碍(参见非专利文献19)、手术后肠梗阻(参见非专利文献4和20)、酸中毒(参见非专利文献1)和吗啡诱导的肠梗阻(参见非专利文献20)。

[0004] {非专利文献1}Scientifica 2013,Article ID 518909(http://dx.doi.org/10.1155/2013/518909),p.25,2013{非专利文献2}The Oncologist 12,pp.594-600,2007{非专利文献3}Support Care Cancer 21,pp.2409-2415,2013{非专利文献4}NeurogastroenterolMotil20,177-184,2008{非专利文献5}Endocrinology 149,pp.455-460,2008{非专利文献6}BMC Pulmonary Medicine 13,pp.37-46,2013{非专利文献7}Methods in Enzymology 514,pp.399-407,2012{非专利文献8}Arch Med Sci 9,pp.166-171,2013{非专利文献9}Frontiers in Endocrinology 4,pp.1-27,2013{非专利文献10}AnninternMed 149,pp.601-611,2008{非专利文献11}Gastric Cancer 17,pp.200-205,2014{非专利文献12}MolNutr Food Res 52,pp.855-866,2008{非专利文献13}Neurogastroenterol Motil 25,pp.e140-e150,2013{非专利文献14}JournalofCardiology 59,pp.8-13,2012{非专利文献15}Curr Opin Clin Nutr Metab Care 16,pp.619-624,2013{非专利文献16}Endocrinology 153,pp.2436-2443,2012{非专利文献

17}Biochemicaland Biophysical ResearchCommunications 389,pp.405-408,2009{非专利文献18}Drug Discovery Today 4,pp.497-506,1999{非专利文献19}Neurogastroenterol Motil 21,pp.71-77,2009{非专利文献20}Peptides 26,pp.1598-1601,2005,{Patent reference 1}KR 2014-7036310A

[0005] 因此,期望找到调节胃促生长素受体作用的新化合物。

发明内容

[0006] 技术问题

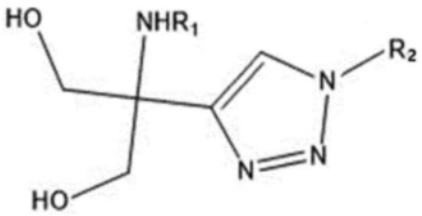
[0007] 作为开发以非常高的特异性与胃促生长素受体结合的胃促生长素受体激动剂的深入研究的结果,本发明的发明人发现基于三唑的化合物表现出这样的功效,并完成了本发明。

[0008] 因此,本发明的目的是提供用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物组合物,其包含作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐。

[0009] 此外,本发明的目的是提供用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物组合物,其由下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成。

[0010] 此外,本发明的目的是提供用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物组合物,其基本上由下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成:

[0011] [式1]

[0012] 

[0013] 其中

[0014] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基,并且

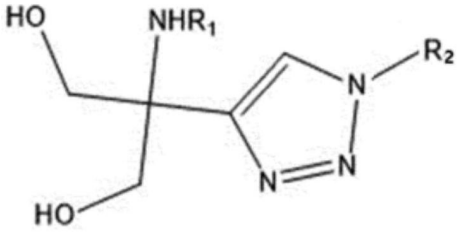
[0015] R_2是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;具有2至10个碳原子的烯基;或者具有2至10个碳原子的炔基。

[0016] 本发明的另一个目的是提供用于预防或改善由胃促生长素受体介导的疾病的食品组合物,其包含作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐。

[0017] 本发明的另一个目的是提供用于预防或改善由胃促生长素受体介导的疾病的食品组合物,其由下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成。

[0018] 此外,本发明的另一个目的是提供用于预防或改善由胃促生长素受体介导的疾病的食品组合物,其基本上由下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成:

[0019] [式1]

[0020] 

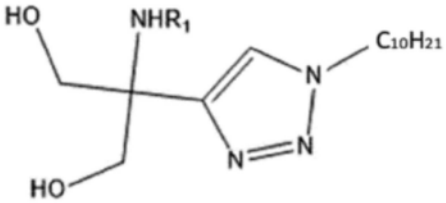
[0021] 其中

[0022] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基,并且

[0023] R_2是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;具有2至10个碳原子的烯基;或者具有2至10个碳原子的炔基。

[0024] 本发明的另一个目的是提供下式2的化合物或其盐:

[0025] [式2]

[0026] 

[0027] 其中

[0028] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基。

[0029] 本发明的另一个目的是提供上述式1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物中的用途。

[0030] 本发明的另一个目的是提供用于治疗由胃促生长素受体介导的疾病的方法,其包括向有需要的个体施用有效量的包含上述式1的化合物或其药学上可接受的盐的组合物。

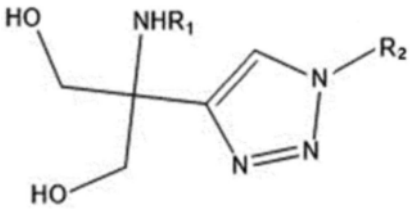
[0031] 问题的解决方案

[0032] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物组合物,其包含作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐。

[0033] 此外,本发明提供了用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物组合物,其由下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成。

[0034] 此外,本发明提供了用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物组合物,其基本上由下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成:

[0035] [式1]

[0036] 

[0037] 其中

[0038] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个

碳原子的烷基羰基,并且

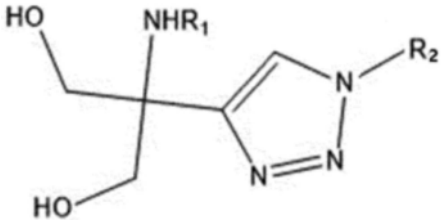
[0039] R_2是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;具有2至10个碳原子的烯基;或者具有2至10个碳原子的炔基。

[0040] 为了实现本发明的另一个目的,本发明提供了用于预防或改善由胃促生长素受体介导的疾病的食品组合物,其包含作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐。

[0041] 此外,本发明提供了用于预防或改善由胃促生长素受体介导的疾病的食品组合物,其由作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成。

[0042] 此外,本发明提供了用于预防或改善由胃促生长素受体介导的疾病的食品组合物,其基本上由作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐组成:

[0043] [式1]

[0044] 

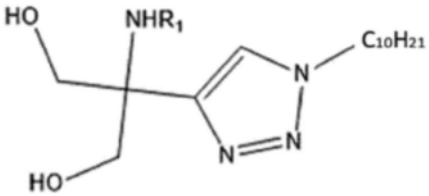
[0045] 其中

[0046] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基,并且

[0047] R_2是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;具有2至10个碳原子的烯基;或者具有2至10个碳原子的炔基。

[0048] 为了实现本发明的另一个目的,本发明提供了下式2的化合物或其盐:

[0049] [式2]

[0050] 

[0051] 其中

[0052] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基。

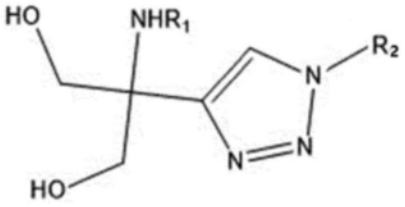
[0053] 为了实现本发明的另一个目的,本发明提供了上述式1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物中的用途。

[0054] 为了实现本发明的另一个目的,本发明提供了用于治疗由胃促生长素受体介导的疾病的方法,其包括向有需要的个体施用有效量的包含上述式1的化合物或其药学上可接受的盐的组合物。

[0055] 在下文中,将详细描述本发明。

[0056] 本发明提供了用于预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物组合物,其包含作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐:

[0057] [式1]

[0058] 

[0059] 其中

[0060] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基,并且

[0061] R_2是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;具有2至10个碳原子的烯基;或者具有2至10个碳原子的炔基。

[0062] 在本发明中,“烷基”是指具有1至15个碳原子的直链或支链烃。烷基的代表性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、3-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、十一烷基和十二烷基,但本发明不限于这些。

[0063] 如本文所用,术语“羰基”是指-C(O)-基团。

[0064] 在本发明中,“烷基羰基”是指通过如上定义的羰基连接到母体分子部分的烷基。烷基羰基的代表性实例包括乙酰基、1-氧代丙基、2,2-二甲基-1-氧代丙基、1-氧代丁基和1-氧代戊基,但本发明不限于这些。

[0065] 在本发明中,当烷基羰基是“取代的”烷基羰基时,它可以被一个或多个选自羟基、卤素、氰基、硝基和氨基的取代基取代。

[0066] 在本发明中,“烯基”是指包含至少一个通过去除两个氢原子而形成的碳-碳双键的具有2至10个碳原子的直链或支链烃。烯基的代表性实例包括乙烯基、2-丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、3-丁烯基、4-戊烯基、5-己烯基、2-庚烯基、2-甲基-1-庚烯基和3-癸烯基,但本发明不限于这些。

[0067] 在本发明中,“炔基”是指包含至少一个碳-碳三键的具有2至10个碳原子的直链或支链烃基。炔基的代表性实例包括乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基,3-丁炔基、2-戊炔基和1-丁炔基,但本发明不限于这些。

[0068] 优选地,在本发明中,R_1可以是氢或乙酰基,R_2可以是具有1至15个碳原子的烷基。更优选地,在本发明中,R_1可以是氢,R_2可以是具有4至15个碳原子的烷基。甚至更优选地,在本发明中,R_1可以是氢,R_2可以是具有6至12个碳原子的烷基。最优选地,在本发明中,R_1可以是氢,R_2可以是具有9-12个碳原子的烷基。

[0069] 具体地,在本发明中,上述式1的化合物可以是2-氨基-2-(1-己基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-庚基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-辛基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-壬基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇、2-氨基-2-(1-十一烷基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇或2-氨基-2-(1-十二烷基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇。

[0070] 根据本发明的一个实施方案,确认了上述式1的化合物对胃促生长素受体表现出非常强的结合力,并且对胃促生长素受体具有非常高的结合特异性。因此,可以预期,上述

式1的化合物具有作为胃促生长素受体激动剂的预防或治疗由胃促生长素受体介导的疾病的效果,并且不影响其他受体的活性,从而表现出低副作用。

[0071] 胃促生长素受体中内源性配体胃促生长素的作用已被证明可导致潜在的生长激素释放、食欲刺激、胃运动、胃酸分泌、积极的心血管作用和直接的骨形成。因此,胃促生长素受体激动剂可以在治疗生长激素缺乏、进食障碍、胃肠道疾病、心血管疾病、骨质疏松症、衰老和分解代谢性或慢性消耗综合征方面取得良好效果。胃促生长素受体激动剂在治疗睡眠障碍方面也可以具有有益效果。

[0072] 某些与胃促生长素受体相关并因此由胃促生长素受体介导的并且胃促生长素受体激动剂可能对其有益的疾病包括肥胖和肥胖相关的风险因素。此外,肥胖相关的风险因素包括糖尿病、糖尿病相关的并发症、代谢综合征和心血管异常(例如,动脉粥样硬化和血脂异常),但本发明不限于这些。

[0073] 由胃促生长素受体介导的其他疾病和/或病症包括:治疗生长激素缺乏症、增加肌肉质量、增加骨密度、治疗男性和女性性功能障碍、促进体重增加、促进体重维持、促进食欲(例如,促进体重增加、体重维持或食欲增强对于患有与体重减轻相关的疾病或正在接受治疗的患者是有用的)。伴有体重减轻的疾病或病症的实例包括厌食症、食欲亢进、癌症恶病质、艾滋病、消耗病、恶病质和虚弱老年人的消瘦。伴有体重减轻的治疗实例包括化学疗法、放射疗法、暂时或永久性固定以及透析。

[0074] 其他疾病或病症包括改善睡眠障碍、充血性心力衰竭、代谢障碍、记忆功能减退、乳腺癌、甲状腺癌、缺血性神经或肌肉损伤。

[0075] 进食障碍包括厌食症,其包括限制性、暴食性和消除性亚型;食欲亢进,其包括消除性和非消除性亚型;肥胖;强迫性进食障碍;暴食性进食障碍;以及其他未指明的进食障碍。

[0076] 胃促生长素受体激动剂可有效治疗的胃肠道病症包括胃阻塞、胃溃疡、炎性肠病如克罗恩病、以及溃疡性结肠炎。本发明的化合物可用于治疗减轻伴有或不伴有食欲/代谢恶病质的食管反流和/或消化不良相关的症状,以及用于治疗与便秘相关的症状如麻痹性肠梗阻或假性梗阻以及便秘优先型肠易激综合征。

[0077] 心血管疾病包括心力衰竭和扩张型心肌病。

[0078] 术后患者中可能出现分解代谢状态或慢性消耗综合征,还包括AIDS相关消耗综合征和癌症相关消耗综合症例如癌症恶病质。

[0079] 已知胃促生长素受体激动剂促进胃酸分泌(参见KR2014-7036310A)。因此,增强胃酸分泌的效果表明,本发明的胃促生长素受体激动剂可以有效治疗伴有低胃酸分泌或无胃酸分泌的各种疾病。

[0080] 在本发明中,酸中毒并不特别局限于某些类型,并且可以包括伴随衰老过程的与年龄相关的酸中毒;慢性胃炎相关的酸中毒;伴有贫血症状的贫血性缺氧;部分胃切除术相关的缺氧症;钙吸收相关的贫血症;维生素D吸收相关的酸中毒;降钙素合成相关的缺氧症;以及药物引起的缺氧症。

[0081] 在本发明的一个方面中,上述式1的化合物可以表现出预防或治疗选自以下的胃促生长素受体疾病的效果:癌症厌食症或恶病质;抗癌药引起的恶病质或厌食症;抗癌药引起的痛觉过敏;COPD或COPD恶病质;少肌症;进食障碍;体重减轻;癌症患者术后全身无力;

慢性呼吸道感染;炎症;IBD;FD;便秘;糖尿病性胃轻瘫;心力衰竭;心肌梗塞;糖尿病性神经病变;生长激素缺乏;患有脊髓损伤的患者的排便障碍;术后肠梗阻;缺氧症;和吗啡诱导的肠阻塞。

[0082] 在本发明中,药学上可接受的盐的实例包括与无机酸(例如,盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸)形成的酸加成盐和与有机酸(例如,乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、马来酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、双羟萘酸、藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、萘二磺酸和聚半乳糖醛酸)形成的盐。所述化合物也可以以本领域技术人员已知的药学上可接受的季铵盐的形式施用,所述季铵盐特别地包括氯化物、溴化物、碘化物、-O-烷基、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、磺酸盐、磷酸盐或羧酸盐(例如,苯甲酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐、乙醇酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、抗坏血酸盐、肉桂酸盐、扁桃酸盐和二苯基乙酸盐),但本发明不限于这些。

[0083] 根据本发明的药物组合物可以以合适的形式与药学上可接受的载体一起配制,并且可另外包含赋形剂或稀释剂。在上文中,“药学上可接受的”是指这样的无毒组合物:该组合物在生理上可接受,并且在向人类施用时不引起过敏反应如胃肠道病症和头晕或类似的反应。

[0084] 药学上可接受的载体可以进一步包括,例如用于经口施用的载体或用于肠胃外施用的载体。用于经口施用的载体可以包括乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁和硬脂酸。此外,用于肠胃外施用的载体可以包括水、合适的油、盐水、含水葡萄糖和乙二醇,并且另外包含稳定剂和防腐剂。合适的稳定剂包括抗氧化剂如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠和抗坏血酸。合适的防腐剂包括苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯以及氯丁醇。本发明的药物组合物除了上述组分之外,还可以包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、调味剂、乳化剂和助悬剂。其他药学上可接受的载体和试剂可以指本领域已知的那些载体和试剂。

[0085] 本发明的组合物可以通过任何方法向包括人类在内的哺乳动物施用。例如,它可以经口或肠胃外施用。肠胃外施用方法包括静脉内施用、肌内施用、动脉内施用、髓内施用、鞘内施用、心内施用、经皮施用、皮下施用、腹膜内施用、鼻内施用、肠内施用、局部施用、舌下施用或直肠施用,但本发明不限于这些。

[0086] 根据上述施用途径,本发明的药物组合物可以配制成用于经口施用或肠胃外施用的制剂。

[0087] 在经口施用制剂的情况下,本发明的组合物可以通过使用本领域已知的方法配制成粉末剂、颗粒剂、片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊剂、溶液剂、凝胶剂、糖浆剂、浆体、混悬剂等。例如,作为经口施用的制剂,片剂或糖衣丸可以通过将活性成分与固体赋形剂混合、研磨混合物、向其中添加合适的助剂并将混合物加工成颗粒混合物来获得。合适的赋形剂的实例包括糖(例如,乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇和麦芽糖醇)、淀粉(例如,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉和马铃薯淀粉)、纤维素(例如,纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和羟丙甲基纤维素)和填充剂如明胶和聚乙烯吡咯烷酮。此外,可以添加交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸或藻酸钠作为崩解剂。此外,本发明的药物组合物还可以包含抗凝剂、润滑剂、湿润剂、调味剂、乳化剂和防腐剂。

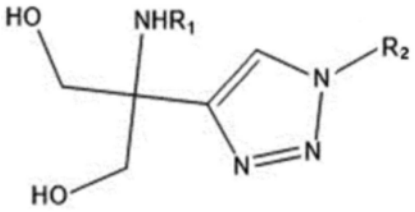
[0088] 在胃肠外施用的制剂的情况下,可以通过本领域已知的方法以注射剂、乳膏、洗剂、外用软膏剂、油、保湿剂、凝胶、气雾剂和鼻吸入剂的形式进行配制。这些制剂描述在所

有药物化学领域中通常已知的处方中。

[0089] 本发明组合物的总有效量可以以单次剂量向患者施用,或可通过长期的多次剂量施用组合物的分次治疗方案向患者施用。本发明的药物组合物中所含的活性成分的量可以根据疾病的严重程度而变化。本发明的药物组合物的总剂量可以优选为每天每kg患者体重约0.01μg至10,000mg,最优选0.1μg至1000mg。然而,药物组合物的剂量是通过考虑制剂方法、施用途径和治疗次数以及其他各种因素(例如,患者的年龄、体重、健康状况、性别、疾病严重程度、饮食和排泄率)来确定的。因此,考虑到这一点,本领域技术人员将能够确定本发明组合物的适当的有效剂量。只要根据本发明的药物组合物表现出本发明的效果,其制剂、施用途径和施用方法就没有特别限制。

[0090] 本发明还提供了用于预防或改善由胃促生长素受体介导的疾病的食品组合物,其包含作为活性成分的下式1的化合物或其药学上可接受的盐:

[0091] [式1]

[0092] 

[0093] 其中

[0094] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基,并且

[0095] R_2是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;具有2至10个碳原子的烯基;或者具有2至10个碳原子的炔基。

[0096] 根据本发明的食品组合物包括所有类型的功能性食品、营养补充剂、健康食品和食品添加剂。上述类型可以根据本领域常规已知的方法以各种形式生产。

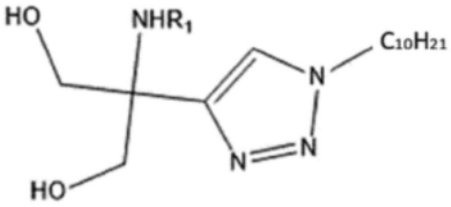
[0097] 例如,作为健康食品,本发明的食品组合物可以以待消费的茶、果汁或饮料的形式生产,或制成待消费的颗粒状、包囊状或粉末状。此外,本发明的食品组合物可以通过与已知具有预防、改善或治疗神经退行性疾病或抑郁症效果的物质或活性成分混合,从而以组合物的形式生产。

[0098] 此外,可以通过将本发明的食品组合物添加到饮料(例如,酒精饮料)、水果及其加工食品(例如,罐装水果、瓶装水果、果酱和橘子酱)、鱼、肉及其加工食品(例如,火腿和香肠玉米牛肉)、面包和面条(例如,乌冬面、荞麦面、拉面、意大利面和通心粉)、果汁、各种饮料、饼干、太妃糖、乳制品(例如,黄油和奶酪)、食用植物油、人造黄油、植物蛋白、甑煮食品、冷冻食品、各种调味料(例如,大豆酱、酱油和酱汁)中来生产功能性食品。

[0099] 基于最终食品的总重量,本发明的食品组合物的量优选为0.01至50重量%,但本发明不限于这些。为了以食品添加剂的形式使用本发明的食品组合物,它可以以粉末或浓缩物的形式生产和使用。

[0100] 本发明还提供了下式2的化合物或其盐:

[0101] [式2]

[0102] 

[0103] 其中

[0104] R_1是氢;具有1至15个碳原子的直链或支链烷基;或者取代或未取代的具有1至5个碳原子的烷基羰基。

[0105] 在上述式中,烷基和烷基羰基可以以与上述相同的方式应用。

[0106] 优选地,R_1是氢或乙酰基。

[0107] 最优选地,式2的化合物可以是2-氨基-2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇。

[0108] 本发明提供的式2化合物的特征在于其用作胃促生长素受体的特异性激动剂,并且可以用作由胃促生长素受体介导的疾病的预防剂或治疗剂。

[0109] 在本发明的一个方面中,本发明提供的式2的化合物包括其盐形式,并且所述盐可以优选地以药学上可接受的盐形式。

[0110] 这些盐的实例包括由无机酸(例如,盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸)形成的酸加成盐和由有机酸(例如,乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、马来酸、抗坏血酸、苯甲酸、单宁酸、双羟萘酸、藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、萘二磺酸和聚半乳糖醛酸)形成的盐,但本发明不限于这些。所述化合物也可以以本领域技术人员已知的药学上可接受的季铵盐的形式施用,所述季铵盐特别地包括氯化物、溴化物、碘化物、-O-烷基、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、磺酸盐、磷酸盐、或羧酸盐(例如,苯甲酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐、乙醇酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、抗坏血酸盐、肉桂酸盐、扁桃酸盐和二苯基乙酸盐)。

[0111] 为了实现本发明的另一个目的,本发明提供了式1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗由胃促生长素受体介导的疾病的药物中的用途。

[0112] 为了实现本发明的另一个目的,本发明提供了用于治疗由胃促生长素受体介导的疾病的方法,其包括向有需要的个体施用有效量的包含式1的化合物或其药学上可接受的盐的组合物。

[0113] 本发明的“有效量”是指当向个体施用时表现出改善、治疗、预防、检测、诊断或抑制或减少由胃促生长素受体介导的疾病的效果的量,“个体”是指动物,优选哺乳动物,尤其是包括人类在内的动物,也可以是来源于动物的细胞、组织、器官或其他物质。个体可以是需要这种效果的患者。

[0114] 本发明的“治疗”综合地指改善由胃促生长素受体介导的疾病或疾病症状,其可以包括治愈、基本上预防或改善疾病的状况,或者减轻、治愈或预防由疾病引起的一种或大多数症状,但本发明不限于这些。

[0115] 在本发明的说明书中,术语“包含”与“包括”或“其特征在于”具有相同的含义,并且根据本发明的组合物或方法不排除未具体提及的额外成分或方法步骤。此外,术语“由……组成”是指排除未具体描述的额外元素、步骤或成分。术语“基本上由……组成”意

指组合物或方法包括所述材料或步骤,并且可以包括基本上不影响其基本特性的材料或步骤。

[0116] 本发明的有益效果

[0117] 本发明提供的化合物显示出对胃促生长素受体具有非常高特异性的强结合力,因此,对于开发由胃促生长素受体介导的疾病的预防剂或治疗剂可以非常有用。

附图说明

[0118] 图1是显示EC50的图,EC50可以代表根据在过表达胃促生长素受体的人胚肾293(HEK293)细胞中胃促生长素和三唑化合物(KARI001、KARI101和KARI201)的浓度的50%的细胞内钙内流。

[0119] 图2是显示在过表达胃促生长素受体的HEK293细胞中通过用10mM胃促生长素和三唑化合物(KARI001、KARI101和KARI201)处理,胃促生长素受体亚信号因子的变化的图(n=3,**p<0.01,***p<0.001)。

[0120] 图3是显示在过表达胃促生长素受体的HEK293细胞中通过用10mM胃促生长素和三唑化合物(KARI001、KARI101和KARI201)处理,胃促生长素受体的细胞内流功效的图(n=6,**p<0.01)。

[0121] 图4a和图4b是显示三唑化合物(KARI201)作为170种G蛋白偶联受体(包括胃促生长素受体)的激动剂或拮抗剂的功效的图。

[0122] 图5a和图5b是显示改善胃排空延迟的效果的图,其可以评估术后肠梗阻(POI)小鼠模型在经口施用不同浓度的三唑化合物(KARI 201)之后的胃运动功能(n=5-10,*p<0.05,**p<0.01)。

[0123] 图6a和图6b是显示改善胃排空延迟的效果的图,其可以评估术后肠梗阻(POI)小鼠模型在经口施用不同浓度的三唑化合物(KARI101)之后的胃运动功能(n=5,**p<0.01,***p<0.001)。

[0124] 图7a至图7d是显示粪便的结肠输送时间(图7a)、粪便的数量和重量(图7b)、饲料摄入量(图7c)和体重(图7d)的图,其可以评估经口施用30mg/kg三唑化合物(KARI 201)之后的术后肠梗阻(POI)小鼠模型的结肠运动功能(n=4,***p<0.001,****p<0.0001)。

[0125] 图8a至图8d是显示粪便的结肠输送时间(图8a)、粪便的数量和重量(图8b)、饲料摄入量(图8c)和体重(图8d)的图,其可以评估经口施用30mg/kg三唑化合物(KARI 101)之后的术后肠梗阻(POI)小鼠模型的结肠运动功能(n=4,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

[0126] 图9a至图9c是确认为了研究三唑化合物(KARI 101和KARI 201)在癌症恶病质小鼠模型中的功效(图9a)以及经口施用10mg/kg所述化合物之后改善肌肉强度和功能的效果(图9b)而进行的实验纲要的图(n=7-8,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)。

[0127] 图10a至图10d是显示经口施用10mg/kg三唑化合物(KARI 101和KARI 201)的持续时间内癌症恶病质小鼠模型的癌症尺寸(图10a)、体重(图10b)、饲料摄入量(图10c)和平均每日饲料摄入量(图10d)(n=9,**p<0.01,****p<0.0001)。

[0128] 图11a至图11d是显示经口施用10mg/kg三唑化合物(KARI 101、KARI 201)之后癌症恶病质小鼠模型的总脂肪重量(图11a)、内脏脂肪重量(表11b)、皮下脂肪重量(图11c)和肌肉重量(图11d)的图(n=6-9,*p<0.05,**p<0.01,****p<0.0001)。

具体实施方式

[0129] 在下文中,将通过以下实施方案详细描述本发明。然而,以下实施方案仅用于说明本发明,并且本发明不限于这些。

[0130] <实验材料和实验方法>

[0131] 0.化合物的合成

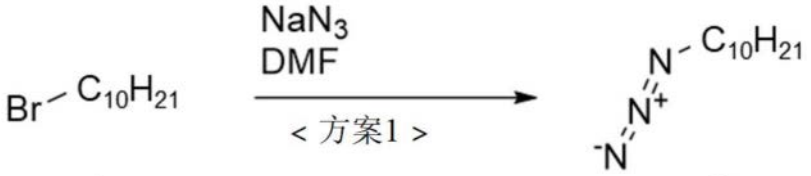
[0132] 根据现有文献(韩国专利第2017324号),生产并合成了物质KARI001和KARI201。用作阳性对照的胃促生长素蛋白购自TORIS。

[0133] KARI001:2-氨基-2-(1-十二烷基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇

[0134] KARI201:2-氨基-2-(1-壬基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇

[0135] 物质KARI101,即化合物2-氨基-2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇,通过以下一系列方法制备。

[0136] 0-1.方案1:1-叠氮基癸烷的合成

[0137] 

1 2

[0138] 为了合成方案1的1-叠氮基癸烷,将叠氮化钠(4.9g,75mmol,2当量)添加到式1的1-溴癸烷(9.9g,37mmol)在DMF(50ml)中的溶液中。将混合物在室温下搅拌2天,并向其中添加冰水(200ml)以用乙醚提取。将有机层用H_2O、盐水和$MgSO_4$干燥并浓缩,获得式2的1-叠氮基癸烷(6.2g,91%)。

[0139] ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ3.28(t,2H),1.62(m,2H,),1.40-1.29(m,14H),0.91(t,3H)

[0140] 0-2.方案2:2-氨基-2-(羟基甲基)丙烷-1,3-二醇的合成

[0141] 

3 4

[0142] 为了合成方案2的2-氨基-2-(羟基甲基)丙烷-1,3-二醇,将Boc_2O(49.5g,1.1当量)添加到式3的三(羟基甲基)-氨基-甲烷(25.0g,0.206mol)在DMF(500ml)中的悬浮液中。将混合物在室温下搅拌2小时后,向其中添加2,2-二甲氧基丙烷(30.4ml,1.2当量)和p-TsOH.H_2O(2.0g,0.05当量)。将混合物在室温下搅拌18小时,并用Et_2O(500ml)稀释。有机层用饱和$NaHCO_3$溶液(300ml)和盐水(200ml)洗涤。将有机层用$MgSO_4$干燥并浓缩。残余物用正己烷结晶以获得为白色固体的式4的5-(羟基甲基)-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯(32.0g,59.4%)。

[0143] ^1H NMR(600MHz,$CDCl_3$):δ5.32(s,1H),3.86-3.80(m,4H),3.73(s,2H),3.68(s,1H),1.46-1.44(m,15H)

[0144] 0-3.方案3:2-氨基-2-(羟基甲基)丙烷-1,3-二醇的合成

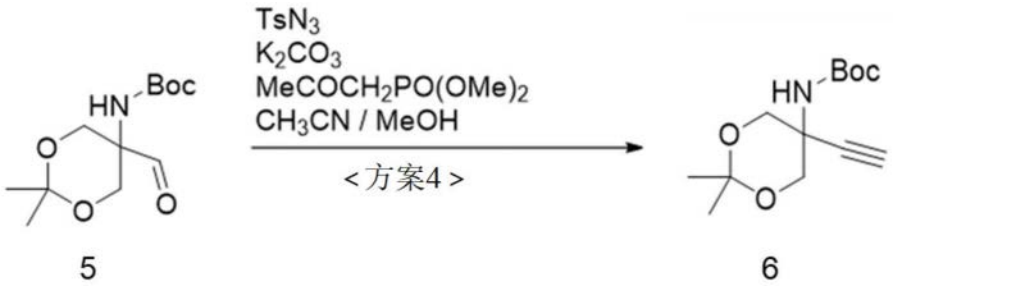
[0145] 

4 5

[0146] 为了合成方案3的5-甲酰基-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯,将草酰氯(33.4ml,3.17当量)在无水MC(340ml)中的溶液与DMSO(43.7ml,5当量)混合。将混合物搅拌15分钟,然后与式4的5-(羟基甲基)-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯(32.0g,0.123mol)在无水MC(340ml)中混合。将混合物搅拌2小时之后,向其中添加Et_3N(171ml,10当量)。将混合物搅拌10分钟,然后移除冷却浴,并将混合物置于室温下。将浅棕色悬浮液用EA(300ml)稀释,并用10%NH_4OH(1,500ml)洗涤。将有机层浓缩并应用于SiO_2柱色谱,通过EA/正己烷=1/10洗脱残余物以获得为白色固体的式5的5-甲酰基-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯(15.0g,47.2%)。

[0147] ^1H NMR(400MHz,C_DCl3):δ9.64(s,1H),5.56(s,1H),4.07(d,2H,J=12.0Hz),3.95(d,2H,J=12.0Hz),1.47(s,15H)

[0148] 0-4.方案4:2-氨基-2-(羟基甲基)丙烷-1,3-二醇的合成

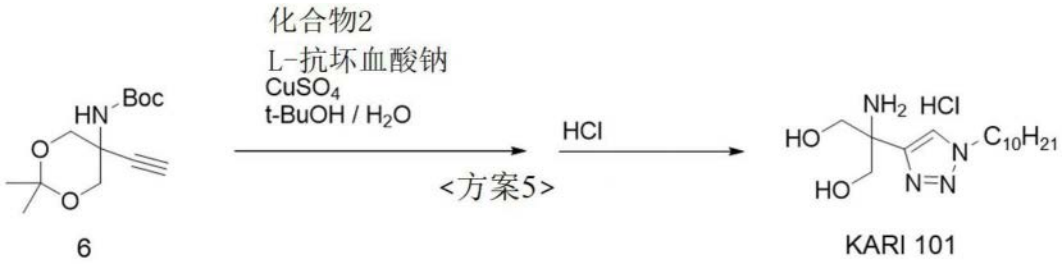
[0149] 

5 6

[0150] 为了合成方案4的5-乙炔基-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯,将二甲基-2-氧代丙基-膦酸酯(1.6g,1.02当量)添加到包含K_2CO_3(3.0g,2.25当量)和对甲苯磺酰基叠氮化物(在甲苯中的14%溶液,15.8ml,1.05当量)的乙腈(50ml)悬浮液中,并将混合物在室温下剧烈搅拌2.5小时。将包含在甲醇(40ml)中的式5的5-甲酰基-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯(2.5g,9.64mmol)的溶液添加到第一反应混合物中。在添加K_2CO_3(2.7g,2.06当量)之后,将混合物搅拌1.5小时并在减压下浓缩,并用MC(200ml)和H_2O(200ml)稀释残余物。将有机层用H_2O(200ml)洗涤,用$MgSO_4$干燥,并在减压下浓缩。残余物通过EA/正己烷=1/9洗脱和应用于SiO_2柱色谱,获得为白色固体的式6的5-乙炔基-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯(2.3g,93.4%)。

[0151] ^1H NMR(400MHz,C_DCl3):δ5.15(s,1H),4.05-3.95(m,4H),2.43(s,1H),1.48-1.38(m,15H)

[0152] 0-5.方案5:2-氨基-2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇盐酸盐的合成

[0153] 

6 KARI 101

[0154] 为了合成2-氨基-2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇(其为方案5的KARI101),将$CuSO_4.5H_2O$(1.56g,6mmol)添加到5-乙炔基-2,2-二甲基-1,3-二噁烷-5-基氨基甲酸叔丁酯(4.0g,15mmol)、方案1的1-叠氮基癸烷(3.16g,17mmol)、L-抗坏血酸钠(4.03g,20mmol)、t-BuOH(60ml)、H_2O(128ml)和MC(104ml)的溶液中。将两相溶液在空气中搅拌18小时,并用MC提取水层。将有机层用$MgSO_4$干燥,并在减压下浓缩。将残余物通过EA/正己烷=1/6洗脱并应用于SiO_2柱色谱,获得固体(6.5g)。将所得固体与浓HCL(21ml)和乙醇(210ml)混合,并在室温下搅拌6小时。在减压下浓缩反应混合物,并从丙酮中重结晶以获得为白色固体的2-氨基-2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇(2.6g,52.4%,分子量298.4)。

[0155] ^1H NMR(500MHz,甲醇-d_4):δ8.06(s,1H),4.41(t,2H),3.95(dd,J=20Hz,15Hz,4H),1.91(t,2H),1.29-1.33(m,14H),0.89(t,3H)

[0156] ^{13}C NMR(500MHz,甲醇-d_4):δ144.9,124.3,63.7(2C),60.8,51.5,33.0,31.3,30.6,30.5,30.4,30.1,27.5,23.7,14.4

[0157] 1.细胞培养

[0158] 人胚肾293(HEK293)细胞购自ATCC,并在37℃和5%CO_2中在包含10% FBS的DMEM培养基中培养。为了过表达胃促生长素受体,用人胃促生长素受体cDNA载体(hGHSRa-pcDNA3.1+,cDNA Resource Center)感染HEK293细胞,并培养48小时。此后,对细胞系中合成的每种三唑化合物和胃促生长素进行处理,以评估作为胃促生长素受体激动剂在细胞内的钙内流、胃促生长素受体亚信号因子和胃促生长素受体细胞内流方面的功效。

[0159] 2.细胞内的钙内流实验

[0160] 用Fluo-2AM(一种钙特异性荧光因子)处理过表达胃促生长素受体的HEK293细胞,1小时后,用包含20mM Hepes、1mM $CaCl_2$、1mM $MgCl_2$和0.7mg/mL丙磺舒的洗涤缓冲液洗涤两次。在用100ul洗涤缓冲液处理细胞之后,在配备有温度和湿度控制设备的激光扫描共聚焦显微镜下,在485nm的激发波长和520nm的发射波长下以10秒的快门间隔对荧光标记的细胞内钙成像1分钟。此后,针对每个浓度添加胃促生长素和三唑化合物,然后在相同条件下成像。基于未用化合物处理时的荧光强度,通过用化合物处理的细胞内钙荧光强度进行计算来对其定量。

[0161] 3.免疫荧光

[0162] 用10mM的胃促生长素和三唑化合物分别处理过表达胃促生长素受体的HEK293细胞,1小时后,将细胞固定并与用于胃促生长素受体的抗-胃促生长素受体(兔,1:500,abcam)一起培养。一天后,将细胞洗涤并与抗兔488抗体一起培养1小时,并通过使用配备有Fluoview SV1000成像软件(Olympus FV1000,日本)的激光扫描共聚焦显微镜进行分析。使用Metamorph软件(Molecular Devices)来量化引入细胞中的胃促生长素受体的染色区域

的面积百分比。

[0163] 4.蛋白质印迹

[0164] 使用蛋白质印迹来分析pAMPK、AMPK、pPI3K、PI3K、pERK和ERK的蛋白质表达。使用pAMPK、AMPK、pPI3K、PI3K、pERK、ERK(cell signaling)和β-肌动蛋白(Santa Cruz)的抗体,并使用ImageJ软件(US National Institutes of Health)进行密度定量。

[0165] 5.G蛋白偶联受体激动剂和拮抗剂的分析

[0166] 三唑化合物(10mM)作为激动剂和拮抗剂对总共170种类型的G蛋白偶联受体的功效由Eurofins Discovery进行。

[0167] 6.术后肠梗阻小鼠模型的建立

[0168] 6-8周龄的小鼠禁食一天,然后用氯胺酮和赛拉嗪的混合物麻醉。然后切开腹部和腹膜,将小肠暴露在无菌纱布垫上。使用无菌棉签从十二指肠到盲肠进行操作5分钟。手术之后,缝合腹部,并使小鼠在保持在32度的笼子中恢复4小时。

[0169] 7.胃排空延迟的评估

[0170] POI手术之后20小时经口施用三唑化合物(10mg/kg、20mg/kg和30mg/kg)。4小时之后,经口施用1.5%甲基纤维素水溶液和0.05%酚红(Sigma)。30分钟之后,取出小鼠的胃,放入0.1N NaOH 2ml溶液中将其匀浆。添加3ml 0.1N NaOH溶液,并在4度下以3000rpm离心10分钟。在向上清液中添加100ml 20%三氯乙酸之后,将混合物在4度下以3000rpm离心10分钟。在向500ml上清液中添加400ml 0.5N NaOH溶液之后,在562nm处测量吸光度。对于基线对照,在经口施用1.5%甲基纤维素水溶液和0.05%酚红之后立即取出胃,并通过上述方法测量获得的样品中的吸光度。胃排空延迟的百分比通过(1-(试验样品吸光度)/(基线对照吸光度)×100计算。

[0171] 8.结肠输送时间的评估

[0172] 为了评估粪便的结肠输送时间,在POI手术之后且缝合之前,将200ul台盼蓝染料注入近端结肠。在POI手术之后4小时经口施用三唑化合物(30mg/kg)。将小鼠转移到代谢笼中,将称重的饲料对其施用,并在24小时内测量用台盼蓝染色的第一次粪便出现的时间。在第24小时,测量粪便的数量和重量,并测量消耗的饲料的重量和小鼠的体重。

[0173] 9.癌症恶病质模型的建立

[0174] 为了建立癌症腺泡模型,从ATCC(CRL-2638)购买CT26(结肠肿瘤26细胞系)细胞,并在37℃和5% CO_2中在包含10%FBS的RPMI1640培养基中培养。将培养的$1x10^6$个细胞皮下注射到10周龄小鼠的腹部右侧。细胞注射之后,每次测量一次右腹部生长的癌症的尺寸、体重和饲料摄入量,并从第9天起每天经口施用10mg/kg三唑化合物。在癌症细胞注射的第18天,进行为期1天的握力测试和转棒实验,以评估肌肉功能。在第20天,将小鼠的皮下脂肪、内脏脂肪和肌肉(股骨、小腿)分离并称重。

[0175] 10.用于评估肌肉功能的握力测试和转棒实验

[0176] 为了评估肌肉功能,通过使小鼠抓握来进行握力测试,方法是让小鼠抓握连接在抓握强度计上的金属网格,抓住小鼠的尾巴,并从后面水平拉动它。在即将失去抓握之前施加到金属网格上的力以g为单位被记录在测量仪器中作为最大拉力,并且整个过程对每个个体进行9次以记录平均值。在转棒实验(Ugo Basile,Comerio,VA,Italy)中,通过使用配备有适当加工的直径为3cm的棒的机器,以4rpm的转速进行至少三次转棒运动,以提供抓握

来测量以秒为单位的所测试动物的耐受时间并记录平均值。每个转棒行为实验每次不超过5分钟。

[0177] 11.统计分析

[0178] 根据SAS统计软件包(9.1版;SAS Institute Inc.,Cary,NC)进行Tukey的HSD检验和方差检验的重复测量分析,用于比较多个组。认为*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001和****p<0.0001是显著性的。

[0179] <实验结果>

[0180] 1.根据细胞内的钙内流的增加确认作为胃促生长素受体激动剂的作用

[0181] 为了确认三唑化合物作为胃促生长素受体激动剂的功效,首先测量了细胞内的钙内流的变化,这是胃促生长素的主要功能。使过表达人胃促生长素受体的HEK293细胞与钙标记的荧光因子反应1小时,然后用每种浓度的胃促生长素和三唑化合物KARI001、KARI101和KARI201处理。结果,确认了细胞内的钙内流随着三种三唑化合物的浓度增加而增加(参见图1)。EC50,即能够诱导50％细胞内钙内流的浓度,被确认为胃促生长素＝39.45nM、KARI001＝128.3nM、KARI101＝188.5nM和KARI201＝272.9nM。

[0182] 也就是说,已经确认这三种三唑化合物可以作为胃促生长素受体激动剂诱导细胞内钙内流。

[0183] 2.作为胃促生长素受体激动剂通过调节胃促生长素受体的G蛋白依赖性亚因子的作用

[0184] 本领域已知,胃促生长素受体是G蛋白偶联受体,并且当胃促生长素与胃促生长素受体结合时,不同亚信号因子的活性根据三种主要类型的G蛋白而受到调节。例如,Gaq依赖性信号传导增加细胞内的钙内流,从而增加AMPK因子磷酸化,Gai/o-依赖性信号传导增加PI3K因子磷酸化。B-抑制蛋白依赖性信号传导增加ERK因子磷酸化或诱导胃促生长素受体的细胞内流入(FASEB J.2019;33(1):518-531)。

[0185] 首先,检查这三种三唑化合物是否可以调节胃促生长素受体的G蛋白依赖性信号转导亚因子的磷酸化。过表达人胃促生长素受体的HEK293细胞用10mM胃促生长素和三种三唑化合物处理,1小时后提取细胞蛋白,并通过使用蛋白质印迹检查亚因子是否被磷酸化。结果,观察到这三种三唑化合物可以增加AMPK因子的磷酸化(参见图2)。

[0186] 此外,为了确认胃促生长素受体细胞内流的作用,过表达人胃促生长素受体的HEK293细胞用10mM胃促生长素和这三种三唑化合物处理,1小时后培养胃促生长素受体,并检查其是否表达细胞内胃促生长素受体。结果,观察到未用胃促生长素和三种三唑处理的细胞在细胞膜中表达胃促生长素受体,而用胃促生长素和三种三唑处理过的细胞在核周细胞质中表达胃促生长素受体(参见图3)。

[0187] 也就是说,发现这三种三唑化合物作为激动剂是有效的,它们能够调节胃促生长素受体的Gaq依赖性信号传导和B-抑制蛋白依赖性信号传导。

[0188] 3.三唑化合物作为胃促生长素受体特异性激动剂的作用

[0189] G蛋白偶联受体家族包括许多类型的受体,包括胃促生长素受体。检查三唑化合物是否具有作为不同类型G蛋白偶联受体的激动剂或拮抗剂的功效。单独用10mM三唑化合物KARI201(激动剂效应)或者将其与每种受体的配体一起(拮抗剂效应)处理表达总共170种G蛋白偶联受体(包括胃促生长素受体)的不同细胞系。结果,确认了KARI201仅作为胃促生长

素受体激动剂表现出83.7％的功效(参见图4a和图4b)。

[0190] 也就是说,通过这一结果,发现KARI201三唑化合物作为胃促生长素受体特异性激动剂是有效的。

[0191] 4.三唑化合物改善胃排空延迟的作用

[0192] 为了确认胃运动促进作用(其为胃促生长素作为胃促生长素受体的代表性生理作用之一),使用了术后肠梗阻(POI)小鼠。与正常小鼠相比,被诱导肠梗阻的POI小鼠显示出延迟胃排空效应,而在POI手术之后20小时施用KARI201和KARI101的POI鼠显示出随着浓度增加的胃排空延迟的显著改善(参见图5a、图5b、图6a和图6b)。

[0193] 也就是说,发现三唑化合物KARI201和KARI101是胃促生长素受体激动剂,并且通过改善胃运动功能而有效改善胃排空延迟。

[0194] 5.三唑化合物改善结肠运动功能

[0195] 基于三唑化合物KARI201和KARI101延迟胃排空的作用,检查了它们是否可以改善POI小鼠粪便的结肠输送时间。POI手术之后4小时施用PBS的小鼠显示出粪便的结肠输送时间长,而施用30mg/kg的KARI201或KARI101的小鼠显示粪便的结肠输送时间显著减少(参见图7a和图8a)。粪便的数量和重量也通过施用KARI201而增加(参见图7b和图8b)。与施用PBS的POI小鼠相比,饲料摄入量也增加了,而它们的体重没有变化(参见图7c、图7d、图8c和图8d)。

[0196] 也就是说,发现三唑化合物KARI201和KARI101作为胃促生长素受体激动剂也改善结肠运动功能,从而有效改善粪便的排泄时间。因此,发现所述三唑化合物作为胃促生长素受体介导的疾病的预防剂或治疗剂可以非常有用。

[0197] 6.三唑化合物改善强度和功能的作用

[0198] 癌症恶病质小鼠被用来确认饲料摄入量的增加,这是胃促生长素对于胃促生长素受体的另一种生理作用,并由此改善脂肪和肌肉损失。为了建立癌症恶病质小鼠模型,将CT26癌症细胞皮下注射到10周龄小鼠的右腹部层。细胞注射之后第9天,确认癌症细胞在右腹部生长,每天经口施用一次10mg/kg KARI101和KARI201。在第18天,进行握力测试和转棒实验以评估肌肉强度功能(参见图9a)。已经确认,注射溶媒的癌症恶病质小鼠的肌肉强度功能降低,而施用KARI101或KARI201的癌症恶病质小鼠的肌肉强度功能显著改善(参见图9b和图9c)。

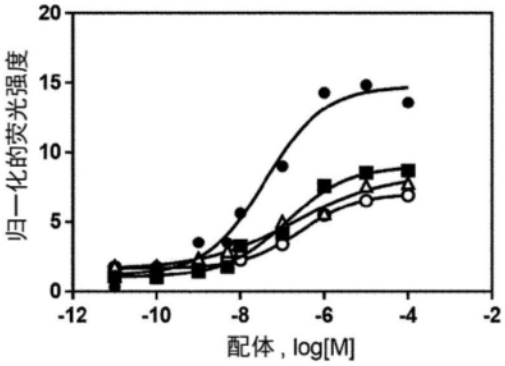
[0199] 7.三唑化合物改善饲料摄入量以及脂肪和肌肉损失的作用

[0200] 基于三唑化合物KARI101和KARI201改善癌症恶病质小鼠模型的肌肉强度和功能的作用,评估了癌症的尺寸、体重和饲料摄入量。与施用溶媒的癌症恶病质小鼠相比,施用KARI101和KARI201不影响癌症恶病质小鼠的癌症尺寸(参见图10a)和体重(参见图10b),但增加了每日饲料摄入量(参见图10c和图10d)。此外,与施用溶媒的癌症恶病质小鼠相比,KARI101和KARI201施用增加了减少的总脂肪(图11a)、内脏脂肪(参见图11b)和皮下脂肪(参见图11c),并增加了减少的肌肉质量(参见图11d)。

[0201] 也就是说,发现作为胃促生长素受体激动剂的三唑化合物KARI201和KARI101可以增加癌症恶病质小鼠所减少的饲料摄入量,从而有效地改善所减少的脂肪和肌肉质量以及肌肉强度功能。

[0202] 工业可用性

[0203] 本发明提供的化合物表现出对胃促生长素受体具有极高特异性的非常强的结合力,因此,对于预防或开发由胃促生长素受体介导的疾病的预防剂或治疗剂非常有用,具有很高的工业可用性。



	EC50
胃促生长素	39.45 nM
KARI001	128.3 nM
KARI101	188.5 nM
KARI201	272.9 nM

图1

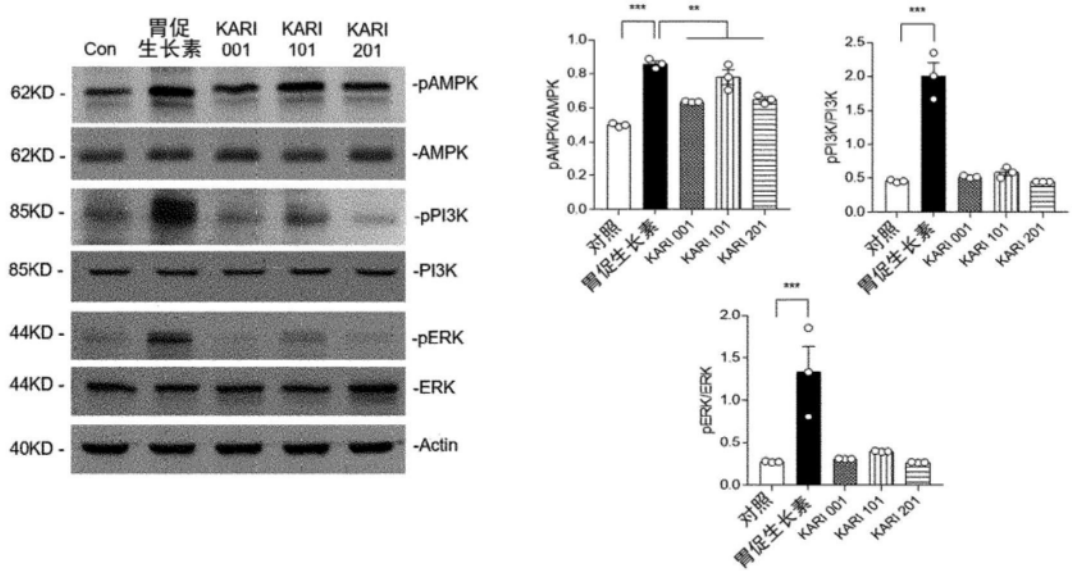


图2

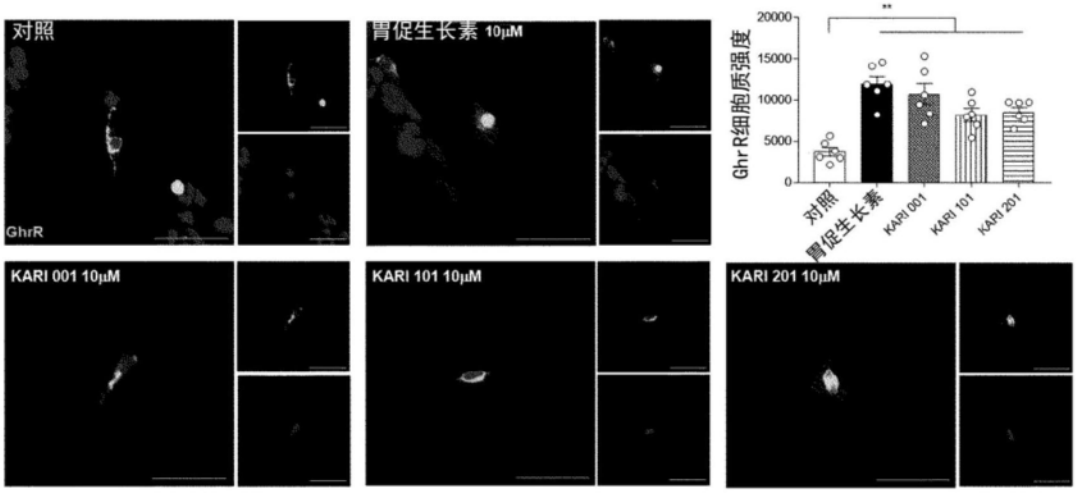

对照
GhrR
胃促生长素 10μM
KARI 001 10μM
KARI 101 10μM
KARI 201 10μM
Ghr R细胞质强度
20000
15000
10000
5000
0
**
对照
胃促生长素
KARI 001
KARI 101
KARI 201

图3

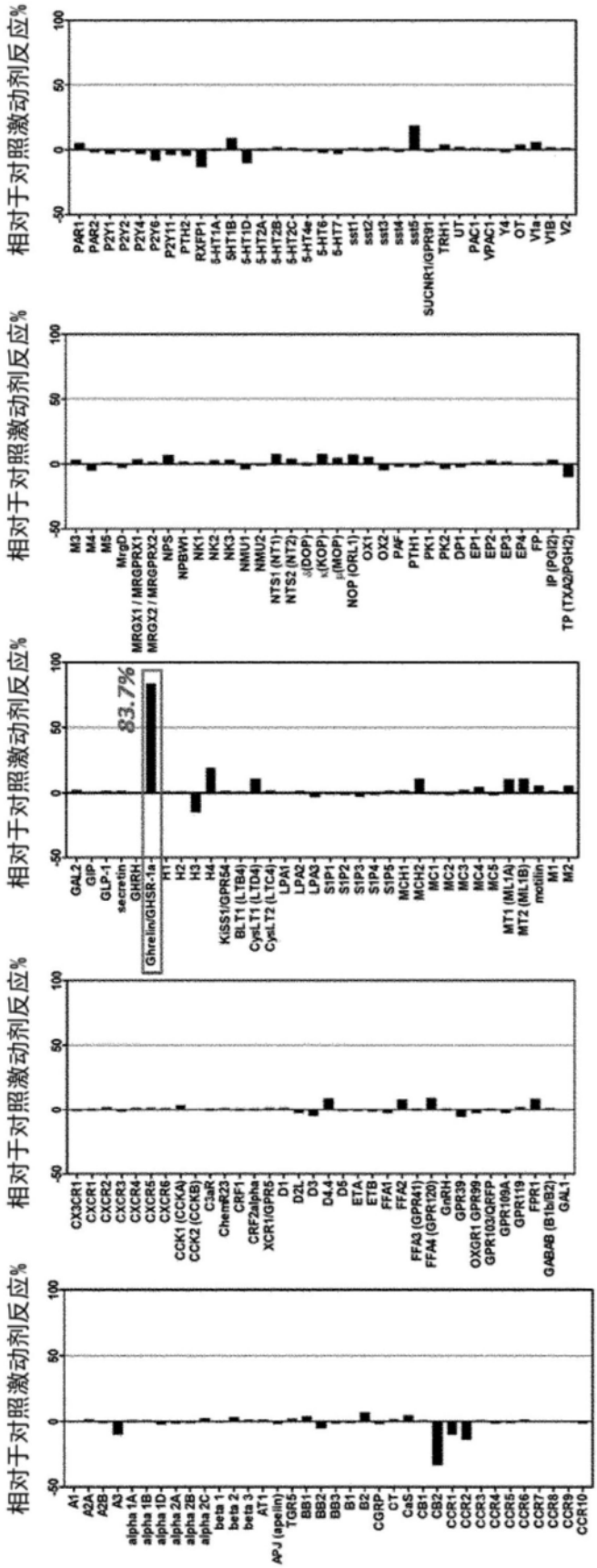

相对于对照激动剂反应%
83.7%
Ghrelin/GHSR-1a
MRGX1 / MRGPRX1
MRGX2 / MRGPRX2

图4a

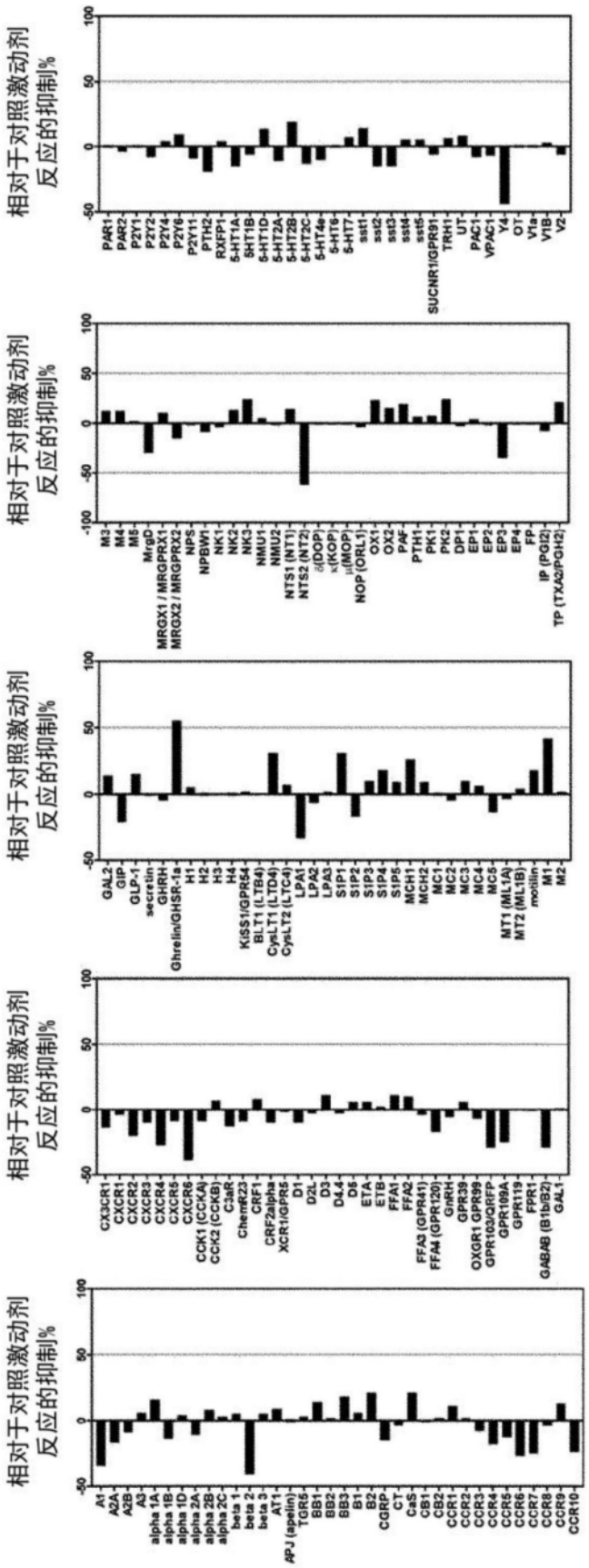

相对于对照激动剂反应的抑制%
100
50
0
-50
P4R1
P4R2
P2Y1
P2Y2
P2Y4
P2Y6
P2Y11
PTH2
RXFP1
5-HT1A
5HT1B
5-HT1D
5-HT2A
5-HT2B
5-HT2C
5-HT4e
5-HT6
5-HT7
sst1
sst2
sst3
sst4
sst5
SUCNR1/GPR91
TRH1
UT
PAC1
VPAC1
Y4
OT
V1a
V1B
V2
相对于对照激动剂反应的抑制%
100
50
0
-50
-100
M3
M4
M5
MrgD
MRGX1 / MRGPRX1
MRGX2 / MRGPRX2
NPS
NPBW1
NK1
NK2
NK3
NMU1
NMU2
NTS1 (NT1)
NTS2 (NT2)
δ(DOP)
κ(KOP)
μ(MOP)
NOP (ORL1)
OX1
OX2
PAF
PTH1
PK1
PK2
DP1
EP1
EP2
EP3
EP4
FP
IP (PGI2)
TP (TXA2/PGH2)
相对于对照激动剂反应的抑制%
100
50
0
-50
GAL2
GIP
GLP-1
secretin
GHRH
Ghrelin/GHSR-1a
H1
H2
H3
H4
KiSS1/GPR54
BLT1 (LTB4)
CysLT1 (LTD4)
CysLT2 (LTC4)
LPA1
LPA2
LPA3
S1P1
S1P2
S1P3
S1P4
S1P5
MCH1
MCH2
MC1
MC2
MC3
MC4
MC5
MT1 (ML1A)
MT2 (ML1B)
motilin
M1
M2
相对于对照激动剂反应的抑制%
100
50
0
-50
CX3CR1
CXCR1
CXCR2
CXCR3
CXCR4
CXCR5
CXCR6
CCK1 (CCKA)
CCK2 (CCKB)
C3aR
ChemR23
CRF1
CRF2alpha
XCR1/GPR5
D1
D2L
D3
D4.4
D5
ETA
ETB
FFA1
FFA2
FFA3 (GPR41)
FFA4 (GPR120)
GnRH
GPR39
OXGR1 GPR99
GPR103/QRFP
GPR109A
GPR119
FPR1
GABAB (B1b/B2)
GAL1
相对于对照激动剂反应的抑制%
100
50
0
-50
A1
A2A
A2B
A3
alpha 1A
alpha 1B
alpha 1D
alpha 2A
alpha 2B
alpha 2C
beta 1
beta 2
beta 3
AT1
APJ (apelin)
TGR5
BB1
BB2
BB3
B1
B2
CGRP
CT
CaS
CB1
CB2
CCR1
CCR2
CCR3
CCR4
CCR5
CCR6
CCR7
CCR8
CCR9
CCR10

图4b

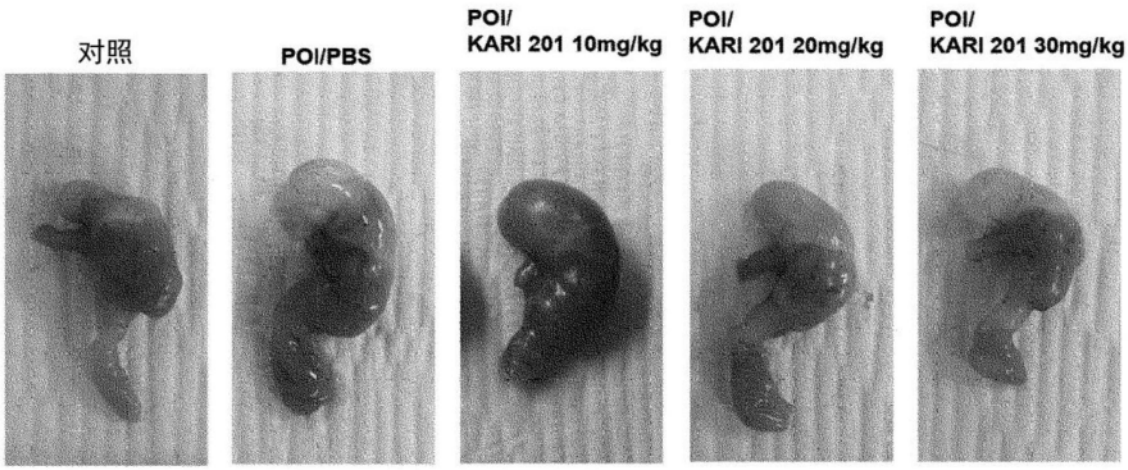

对照
POI/PBS
POI/
KARI 201 10mg/kg
POI/
KARI 201 20mg/kg
POI/
KARI 201 30mg/kg

图5a

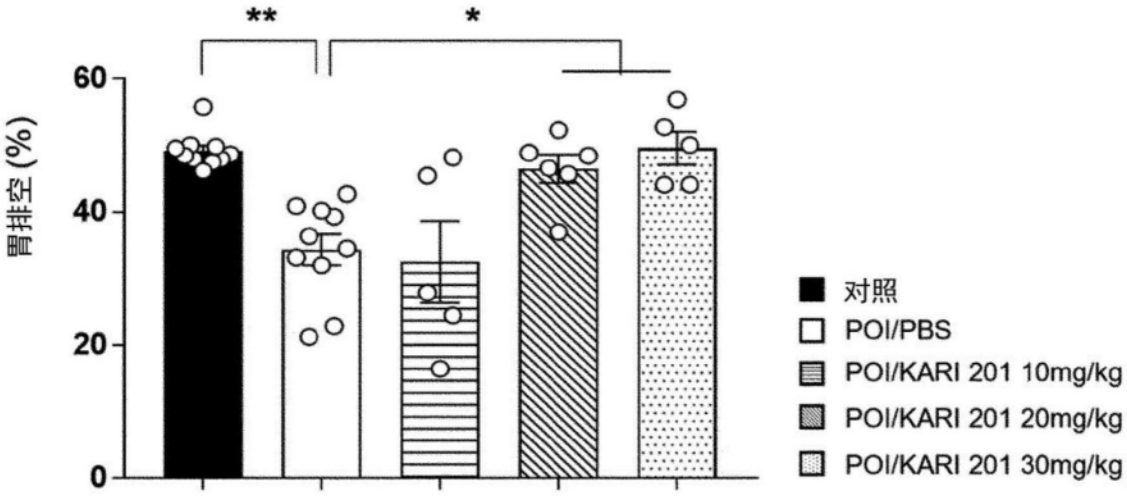

**
*
60
40
20
0
胃排空 (%)
对照
POI/PBS
POI/KARI 201 10mg/kg
POI/KARI 201 20mg/kg
POI/KARI 201 30mg/kg

图5b

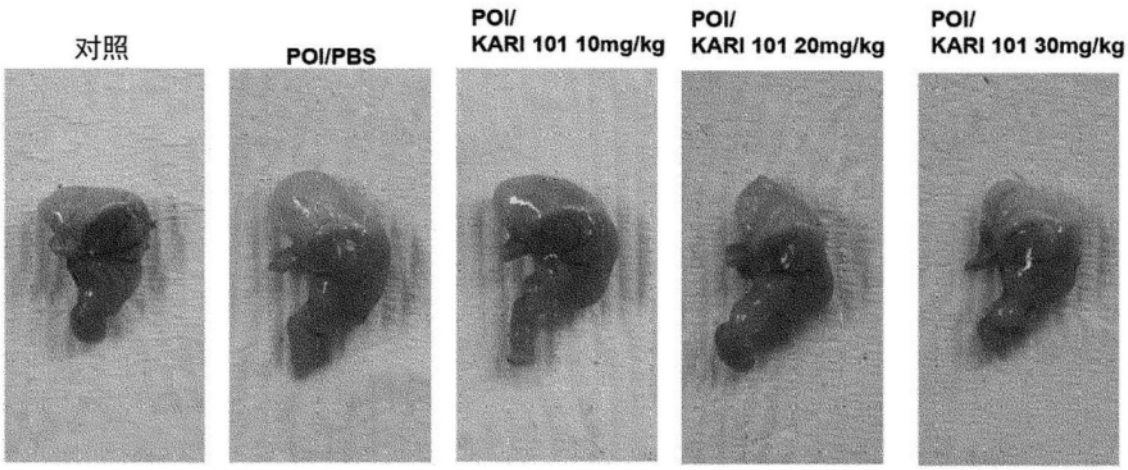

对照
POI/PBS
POI/
KARI 101 10mg/kg
POI/
KARI 101 20mg/kg
POI/
KARI 101 30mg/kg

图6a

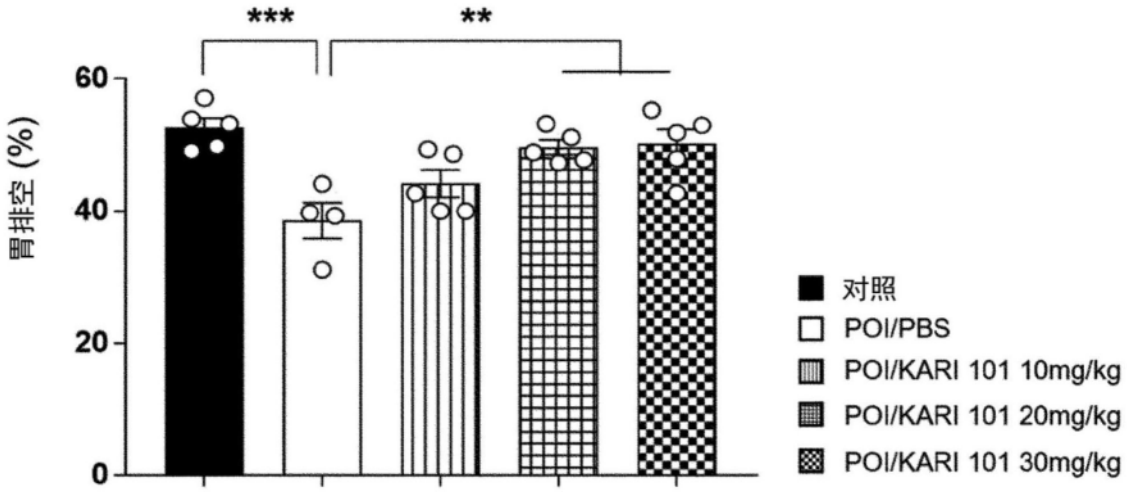

***
**
60
40
20
0
胃排空 (%)
对照
POI/PBS
POI/KARI 101 10mg/kg
POI/KARI 101 20mg/kg
POI/KARI 101 30mg/kg

图6b

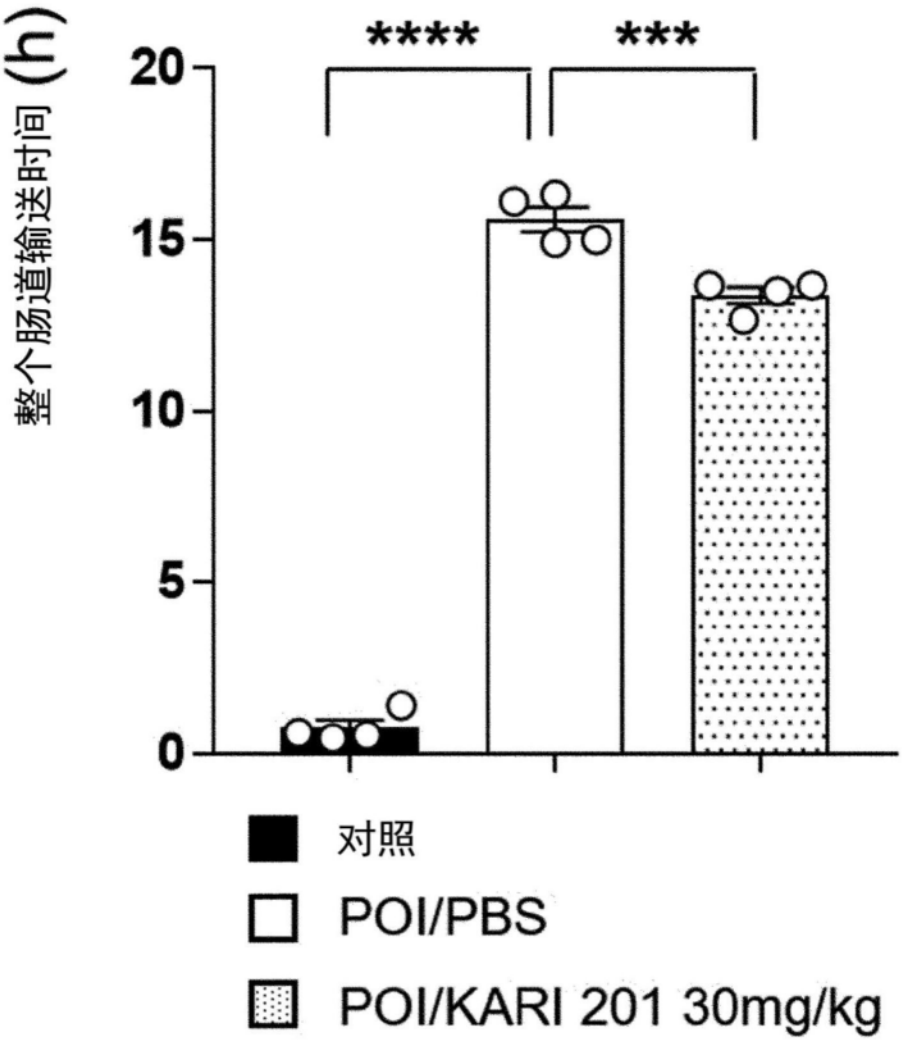

整个肠道输送时间 (h)
****
***
20
15
10
5
0
对照
POI/PBS
POI/KARI 201 30mg/kg

图7a

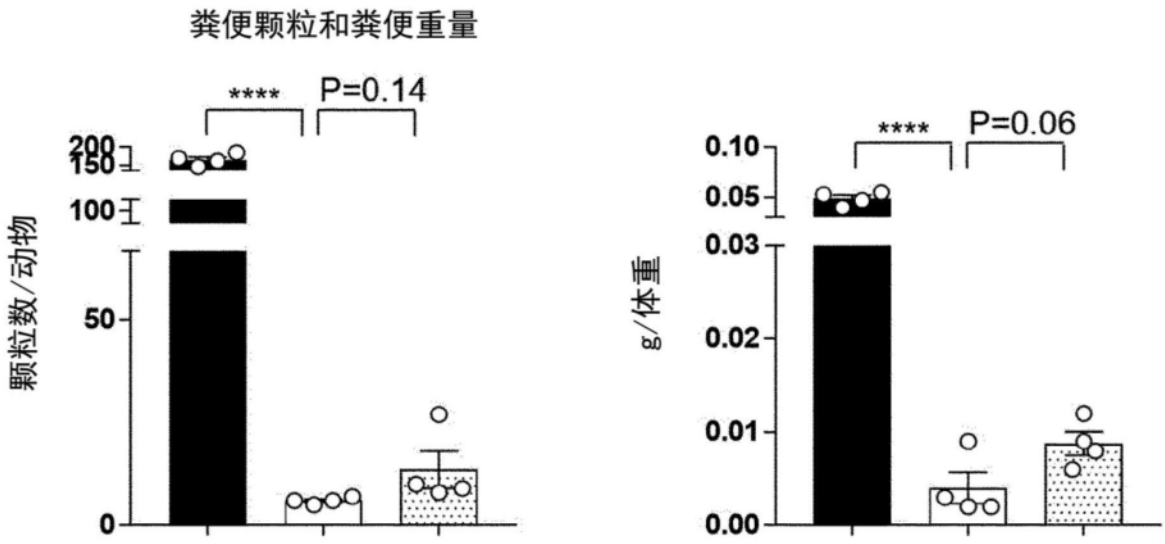

粪便颗粒和粪便重量
****
P=0.14
颗粒数/动物
200
150
100
50
0
****
P=0.06
g/体重
0.10
0.05
0.03
0.02
0.01
0.00

图7b

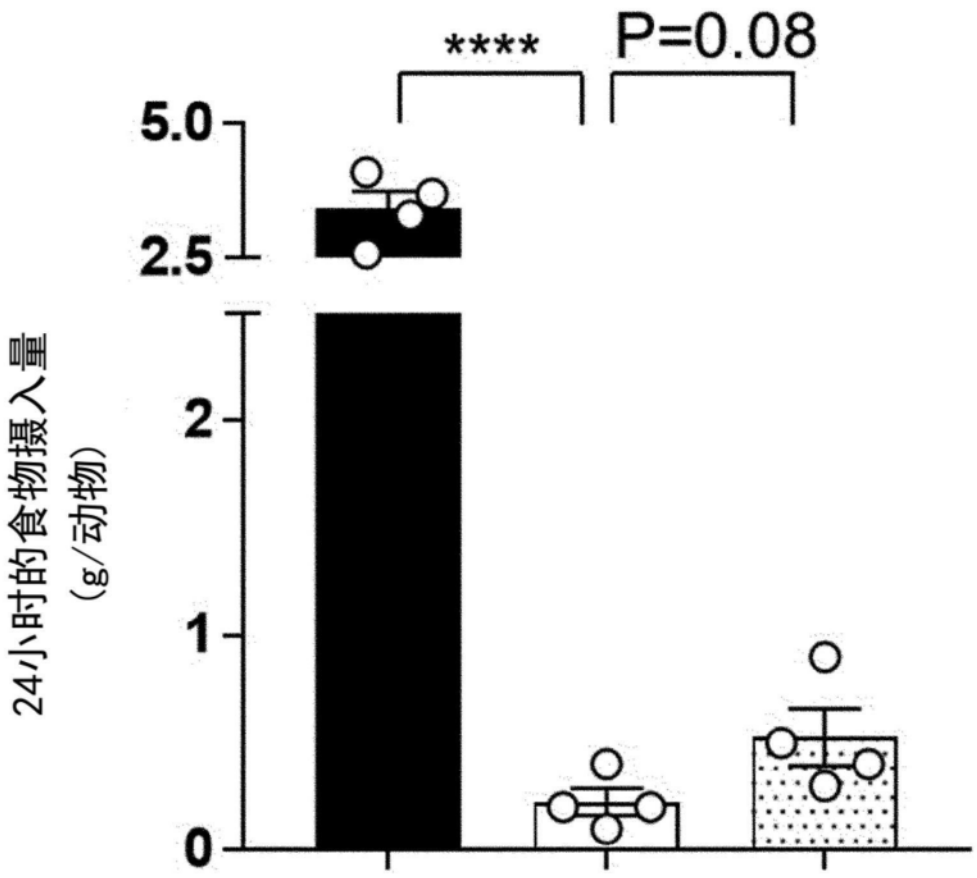


图7c

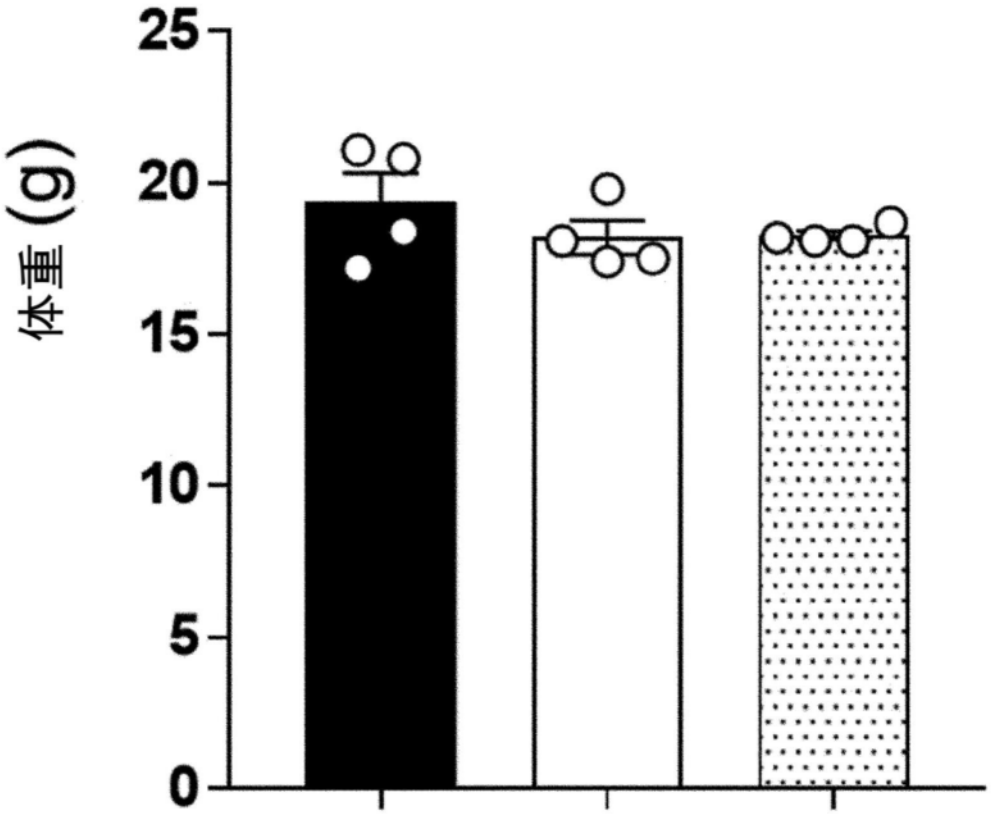


图7d

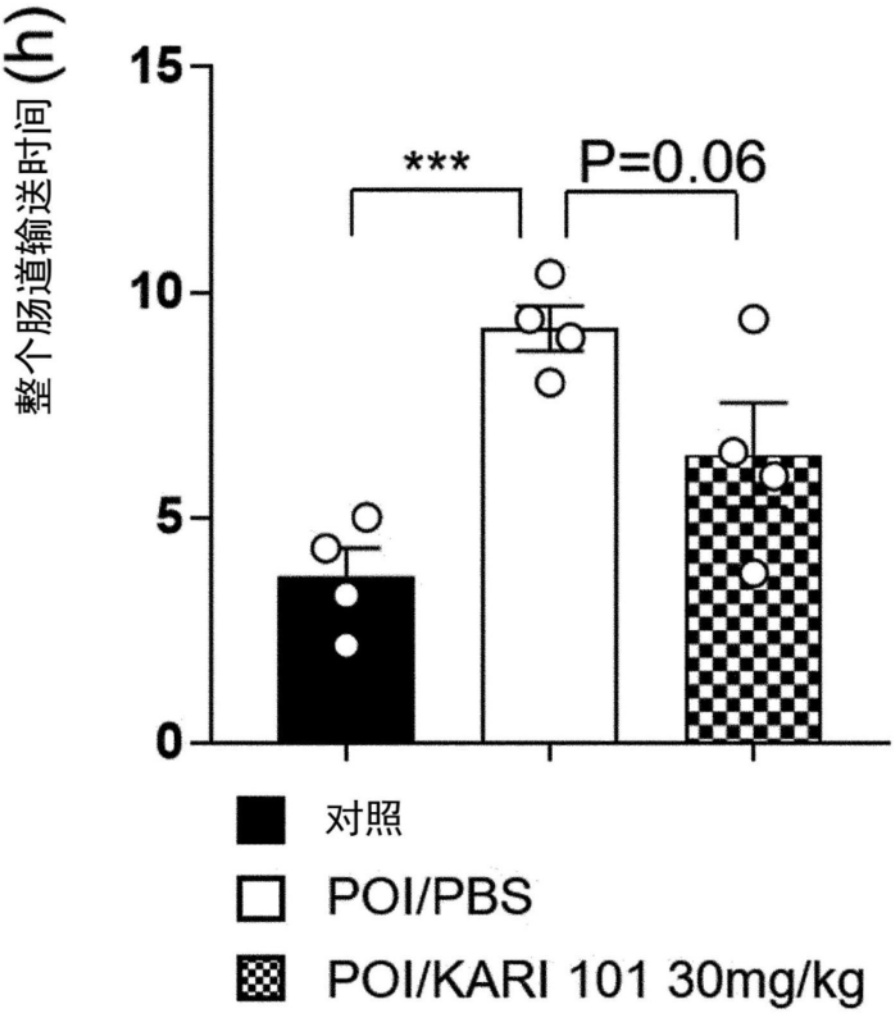

整个肠道输送时间 (h)
15
10
5
0
***
P=0.06
对照
POI/PBS
POI/KARI 101 30mg/kg

图8a

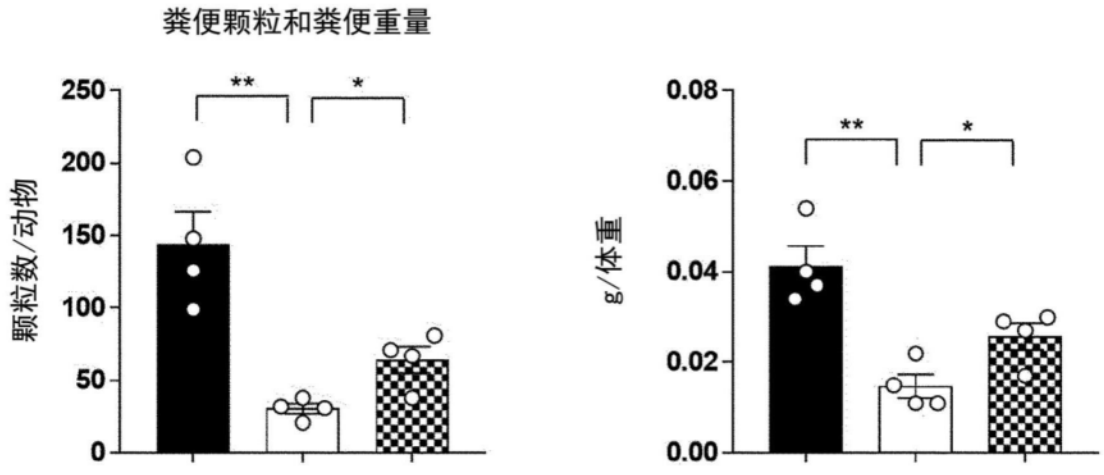

粪便颗粒和粪便重量
颗粒数/动物
250
200
150
100
50
0
**
*
g/体重
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
**
*

图8b

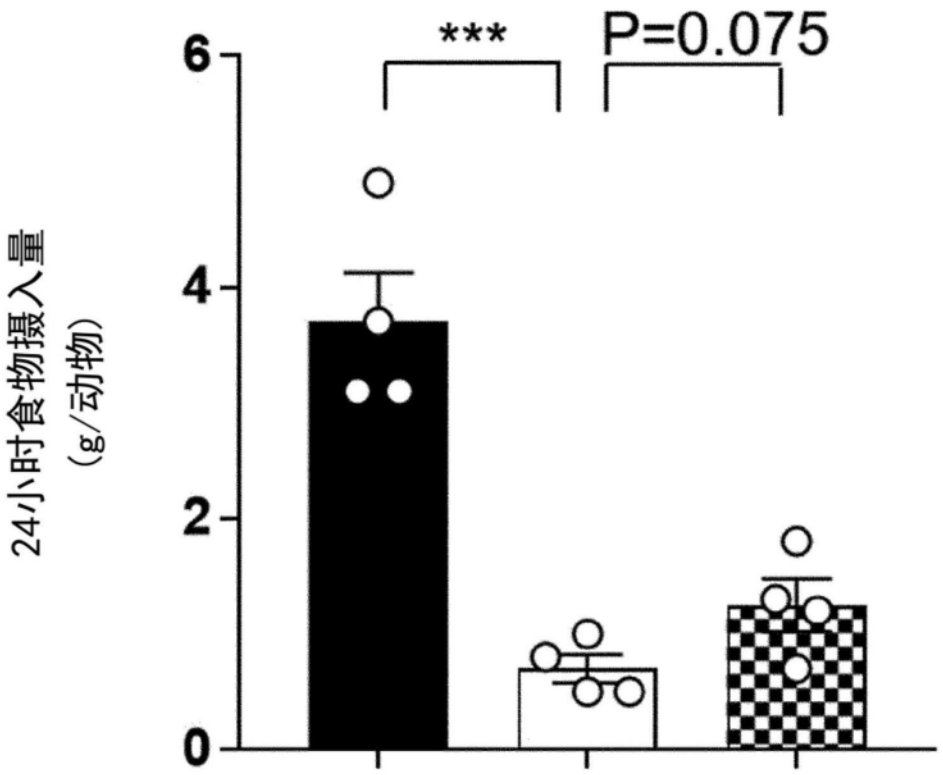


图8c

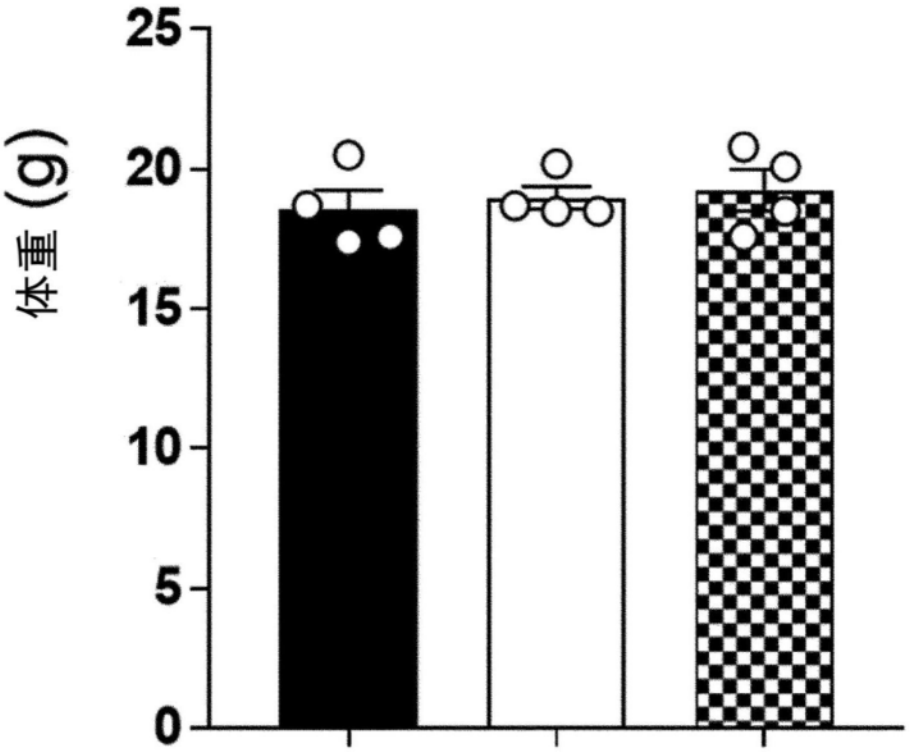


图8d


行为测试
D1：握力测试
D2：转棒实验
第1天
第9天
第18天
第20天
细胞注射
KARI101或KARI201每天口服一次

图9a

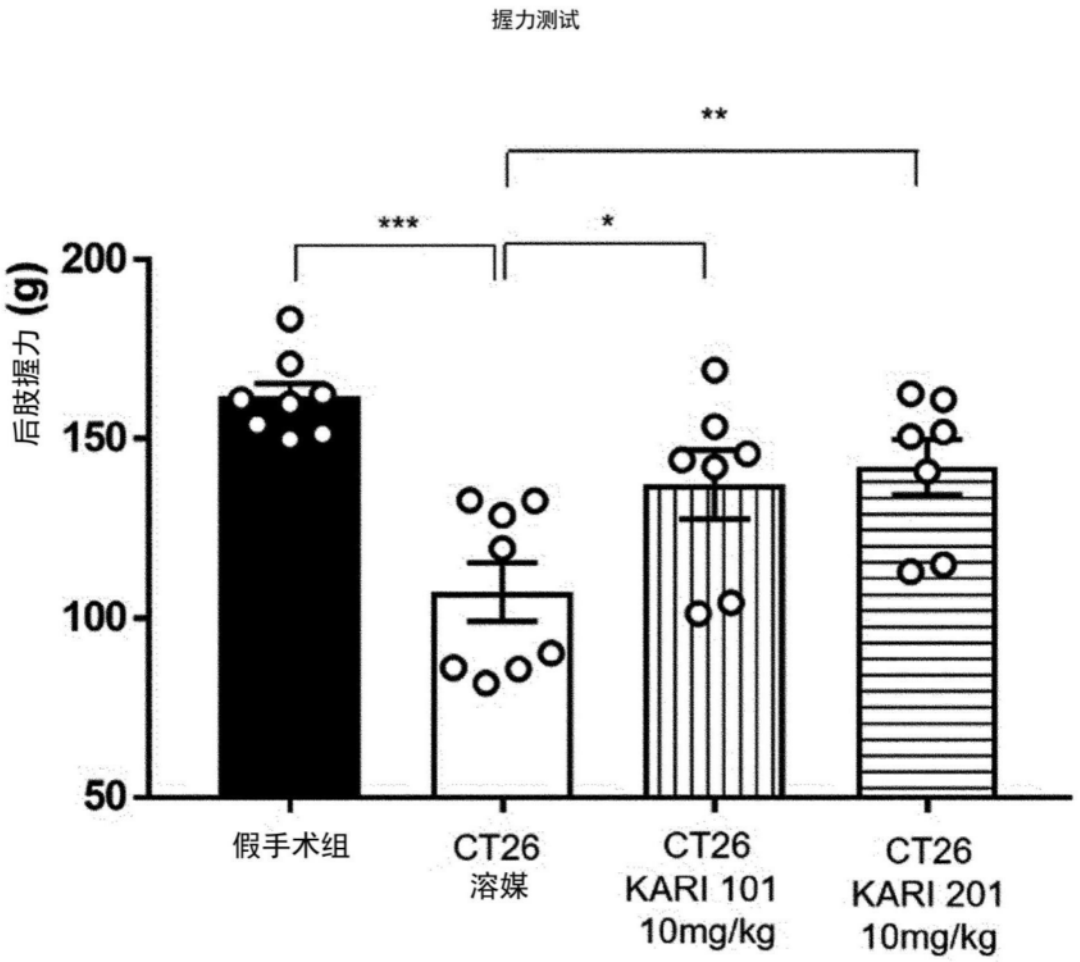

握力测试
后肢握力 (g)
200
150
100
50
**
***
*
假手术组
CT26
溶媒
CT26
KARI 101
10mg/kg
CT26
KARI 201
10mg/kg

图9b

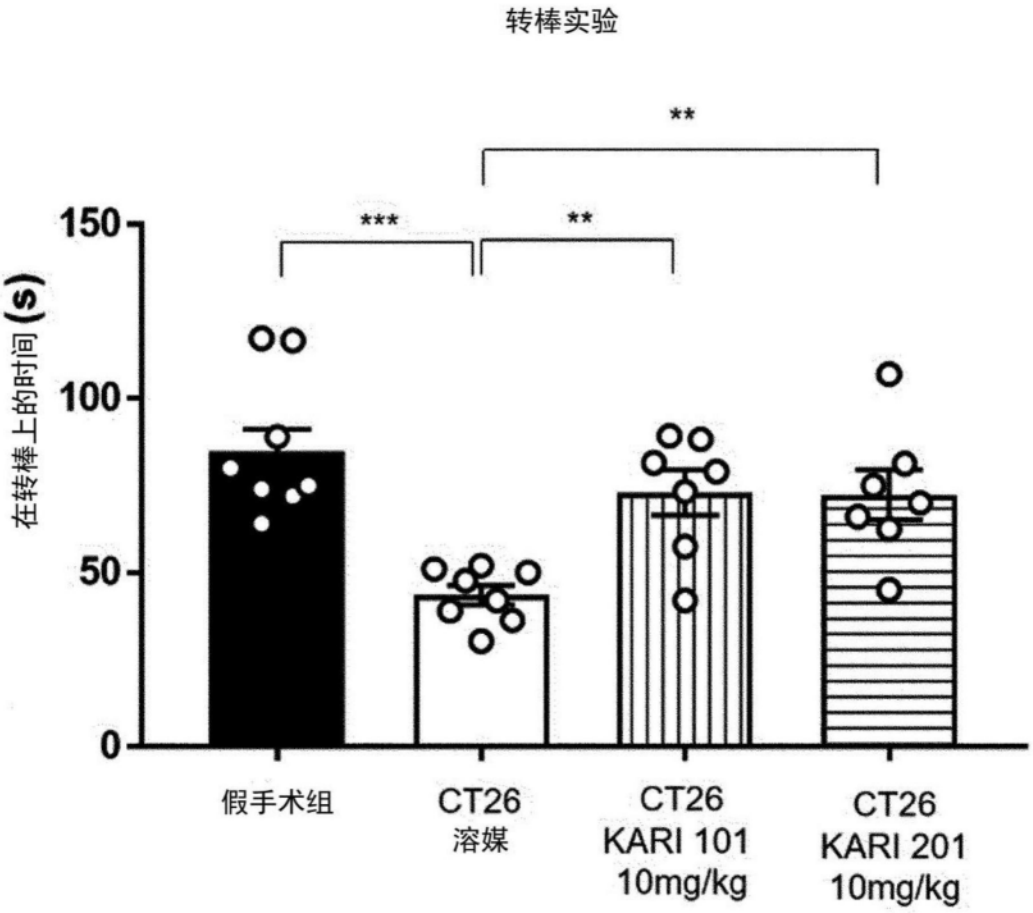

转棒实验
**
***
**
150
100
50
0
在转棒上的时间 (s)
假手术组
CT26
溶媒
CT26
KARI 101
10mg/kg
CT26
KARI 201
10mg/kg

图9c

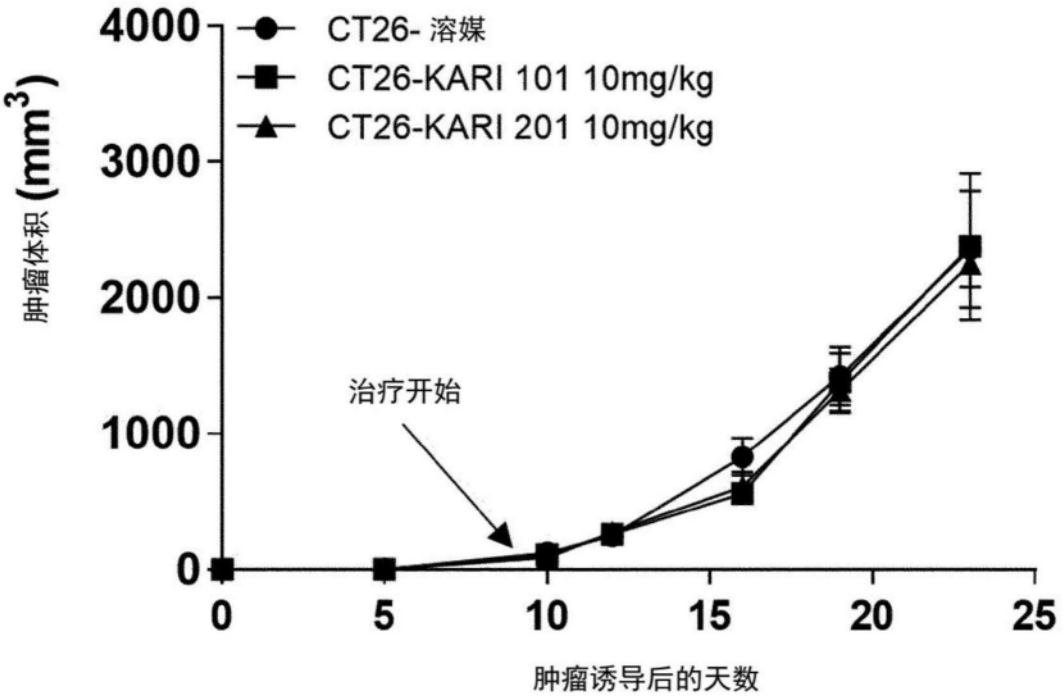

4000
3000
2000
1000
0
肿瘤体积 (mm3)
CT26- 溶媒
CT26-KARI 101 10mg/kg
CT26-KARI 201 10mg/kg
治疗开始
0
5
10
15
20
25
肿瘤诱导后的天数

图10a

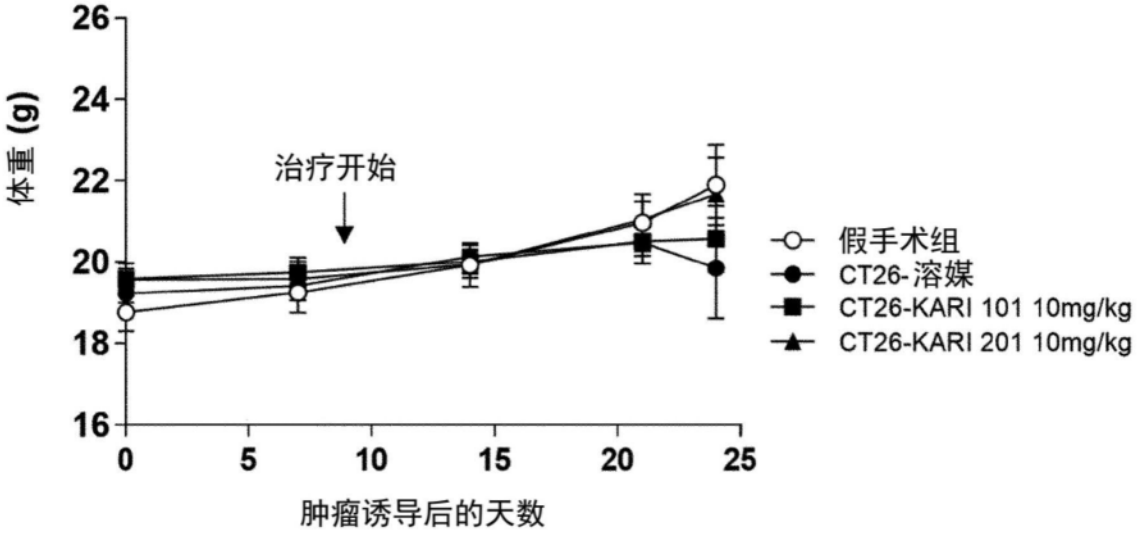

26
24
22
20
18
16
体重 (g)
治疗开始
假手术组
CT26- 溶媒
CT26-KARI 101 10mg/kg
CT26-KARI 201 10mg/kg
0
5
10
15
20
25
肿瘤诱导后的天数

图10b

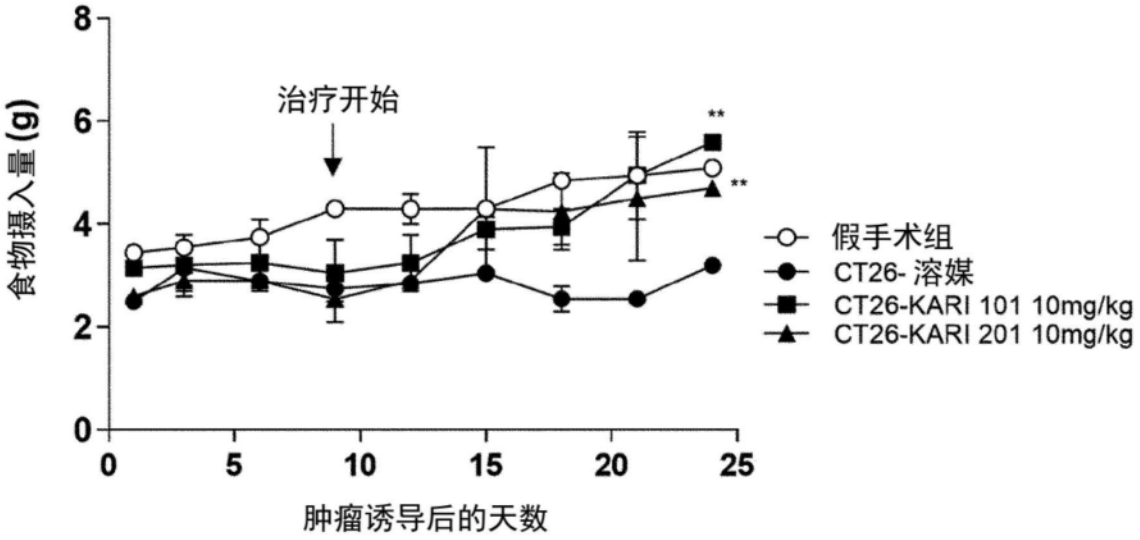

治疗开始
食物摄入量(g)
肿瘤诱导后的天数
假手术组
CT26- 溶媒
CT26-KARI 101 10mg/kg
CT26-KARI 201 10mg/kg
**
**

图10c

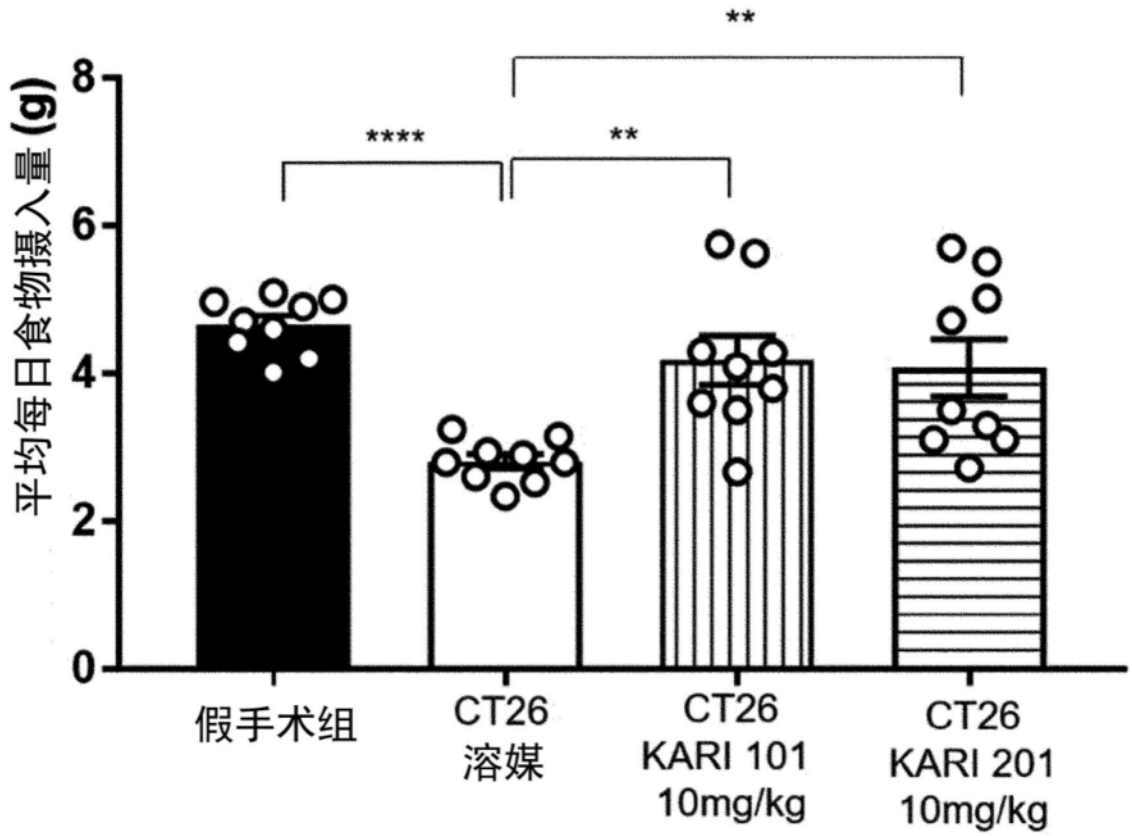

平均每日食物摄入量(g)
****
**
**
假手术组
CT26
溶媒
CT26
KARI 101
10mg/kg
CT26
KARI 201
10mg/kg

图10d

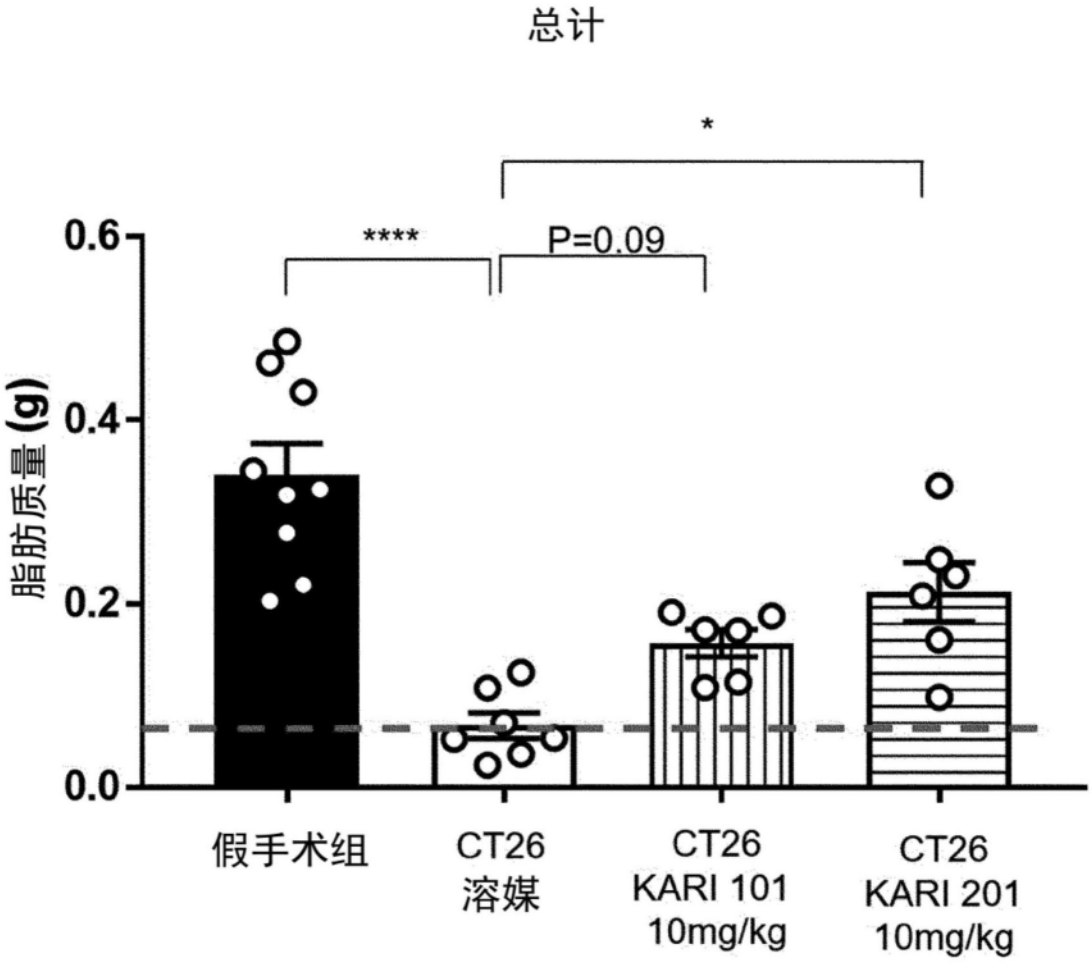

总计
*
****
P=0.09
0.6
0.4
0.2
0.0
脂肪质量(g)
假手术组
CT26
溶媒
CT26
KARI 101
10mg/kg
CT26
KARI 201
10mg/kg

图11a

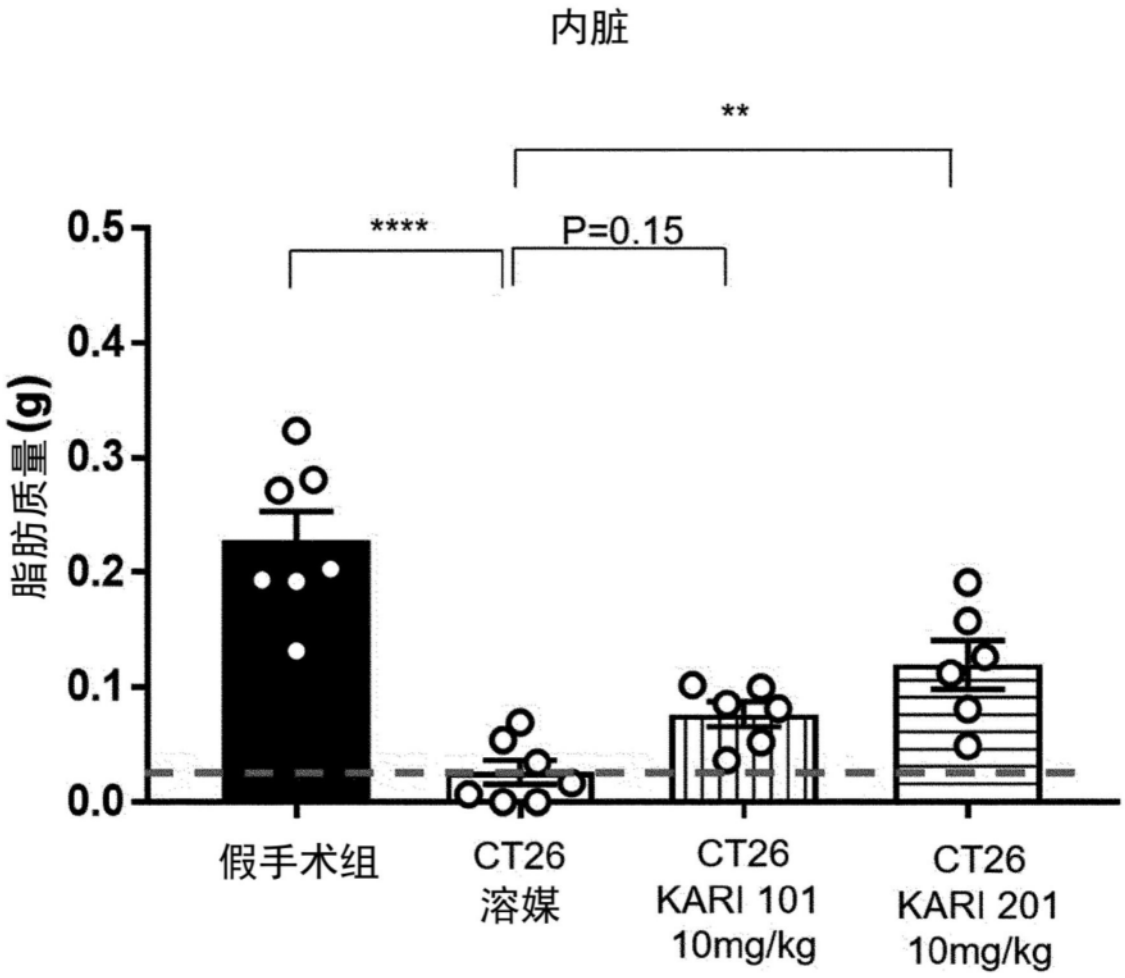

内脏
**
****
P=0.15
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
脂肪质量(g)
假手术组
CT26
溶媒
CT26
KARI 101
10mg/kg
CT26
KARI 201
10mg/kg

图11b

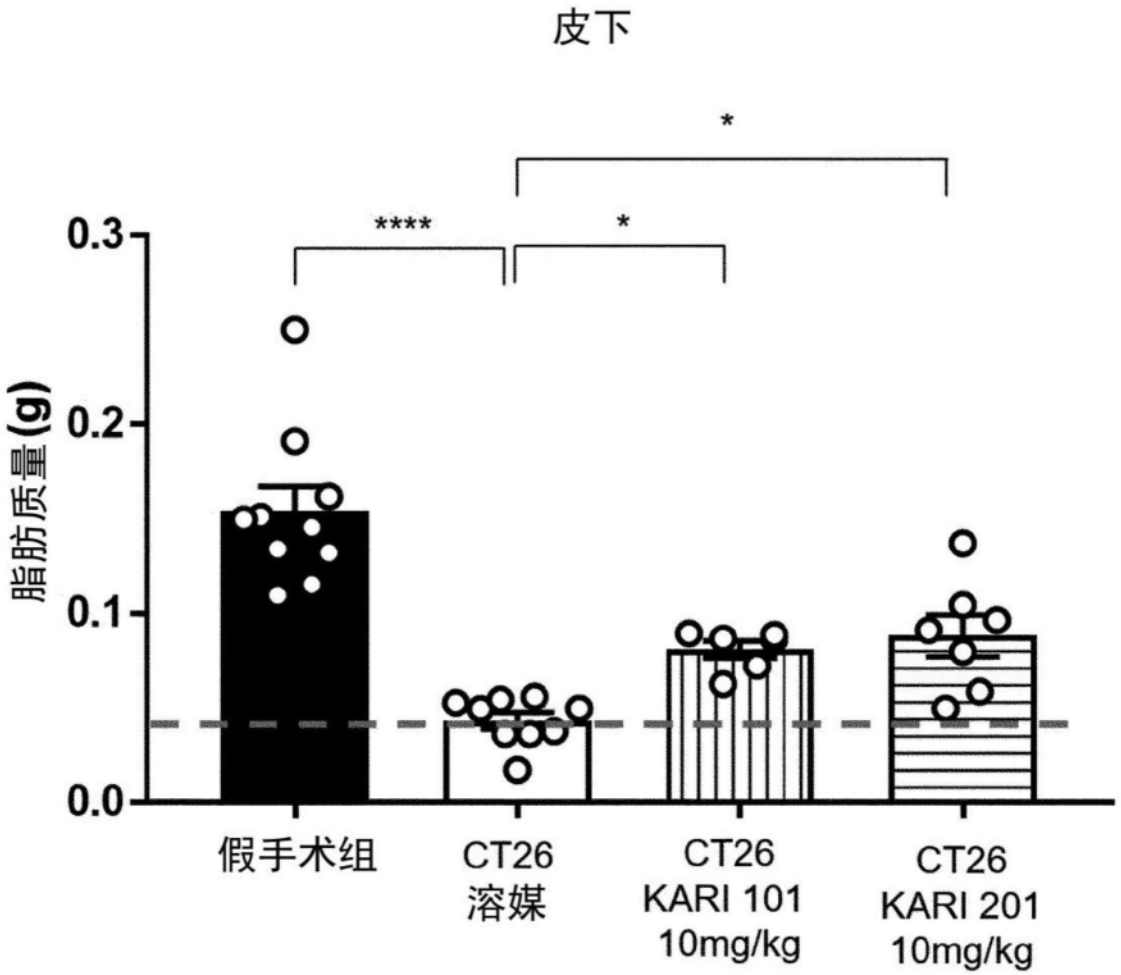

皮下
脂肪质量(g)
0.3
0.2
0.1
0.0
****
*
*
假手术组
CT26
溶媒
CT26
KARI 101
10mg/kg
CT26
KARI 201
10mg/kg

图11c

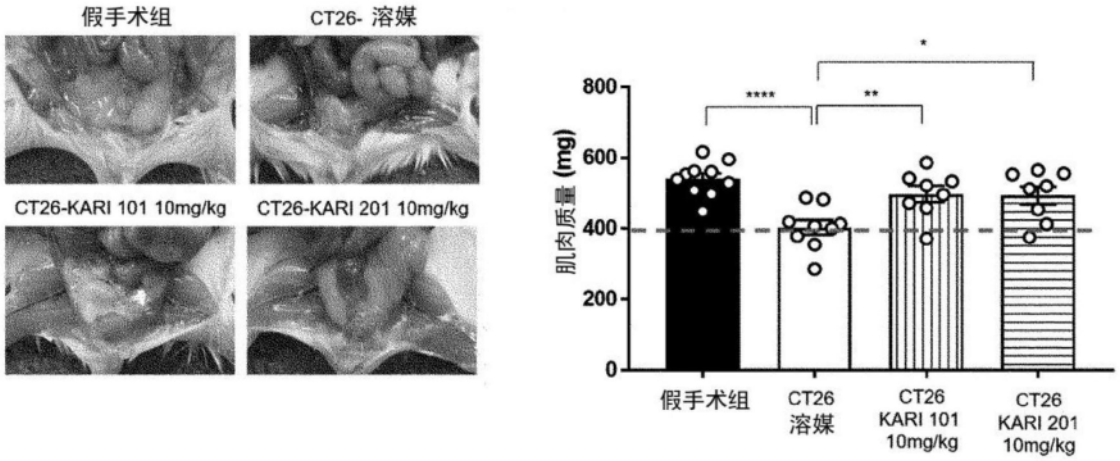

假手术组
CT26- 溶媒
CT26-KARI 101 10mg/kg
CT26-KARI 201 10mg/kg
肌肉质量 (mg)
800
600
400
200
0
****
**
*
假手术组
CT26
溶媒
CT26
KARI 101
10mg/kg
CT26
KARI 201
10mg/kg

图11d