



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110325182 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 23

(21) 申请号 201780077323.2  
(22) 申请日 2017.10.16  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 110325182 A  
(43) 申请公布日 2019.10.11  
(30) 优先权数据  
    62/408,459 2016.10.14 US  
    62/570,973 2017.10.11 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
    2019.06.13  
(86) PCT国际申请的申请数据  
    PCT/IB2017/056417 2017.10.16  
(87) PCT国际申请的公布数据  
    W02018/069907 EN 2018.04.19  
(73) 专利权人 蒙得维的亚巴斯德研究所  
    地址 乌拉圭蒙特威德市  
    专利权人 乌拉圭共和国大学  
        卡洛斯·鲍贾尼  
(72) 发明人 卡洛斯·鲍贾尼  
        格洛里亚·洛佩斯

卡洛斯·埃斯康德  
乔治·罗德里格斯·杜阿尔特  
威廉姆斯·波卡尔·昆塔  
罗西娜·达普托·卡普乔  
格尔曼·加柳西·洛佩斯  
玛丽亚·加拉特·努涅斯  
马塞洛·希尔  
梅塞德斯·塞戈维亚  
(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240  
    专利代理师 李海霞

(51) Int.Cl.  
    A61K 31/192 (2006.01)  
    A61K 45/06 (2006.01)  
    A61P 43/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
    JP S4834850 A,1973.05.22  
    WO 2005037323 A2,2005.04.28  
    US 2006247263 A1,2006.11.02  
    审查员 陈笑宇

权利要求书1页 说明书11页 附图17页

(54) 发明名称

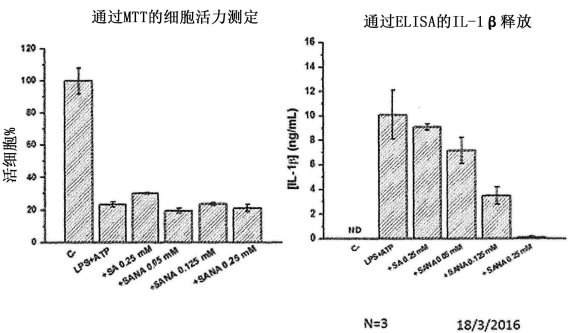
使用多能抗炎和代谢调节剂治疗炎症相关病症的方法

(57) 摘要

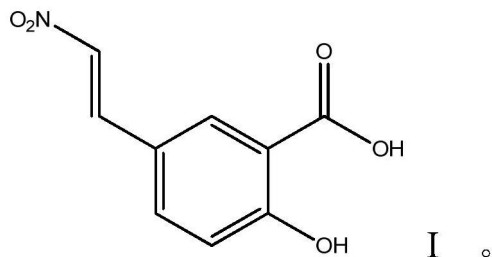
治疗急性和慢性炎症病症、组织移植排斥和/或器官移植排斥的方法,包括向需要其的受试者施用治疗有效量的多能抗炎和代谢调节剂,任选地与一种或多种第二治疗剂组合,及其药物组合物。

通过SANA的炎性体调控

在第一信号处施用的化合物



1. 治疗有效量的式I化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗需要其的受试者的急性和慢性炎症病症的药物中的用途：



2. 根据权利要求1所述的用途，其中所述治疗还包括施用第二治疗剂。

3. 根据权利要求2所述的用途，其中所述第二治疗剂选自由以下组成的群组：抗血小板剂、血管紧张素II抑制剂、ACE抑制剂、Ca<sup>++</sup>通道阻滞剂、胰岛素增敏剂、HMG-CoA还原酶抑制剂、β阻滞剂、甾体抗炎药、甾体抗炎药、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 调节剂及其组合。

## 使用多能抗炎和代谢调节剂治疗炎症相关病症的方法

[0001] 相关申请的引证

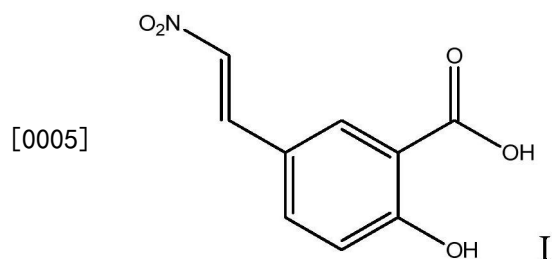
[0002] 本申请要求于2016年10月14日提交的美国临时申请第62/408,459号以及于2017年10月11日提交的美国临时申请第62/570,973号的权益。

### 背景技术

[0003] 急性和慢性炎症似乎是现今大多数(如果不是全部)慢性疾病的基础,包括心血管疾病、2型糖尿病、慢性肾病、阿尔茨海默病和癌症[1]。然而,经典的抗炎药——包括非甾体抗炎药(NSAID)和甾体抗炎药(SAID)——并未作为常规治疗这些疾病的一部分。常见的治疗方法包括抗血小板药、血管紧张素II抑制剂、胰岛素增敏剂、HMG-CoA还原酶抑制剂和β阻滞剂。此外,经典的NSAIDs和SAID在治疗心血管、代谢、神经退行性疾病、癌症和慢性肾脏疾病方面没有任何益处(如果无不利影响)[2]。因此,本文描述的本发明的实施方案涵盖低级慢性炎症的抗炎治疗,该低度慢性炎症构成当今大多数慢性非传染性疾病的基础。

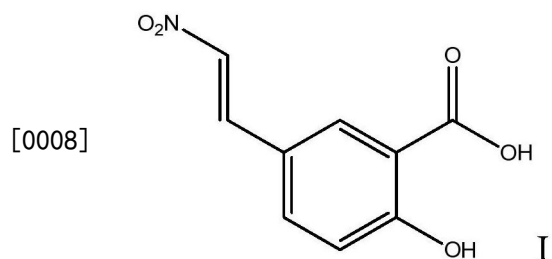
### 发明内容

[0004] 本发明范围内的一个实施方案是治疗急性和慢性炎性病症的方法,该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效量的式I化合物:



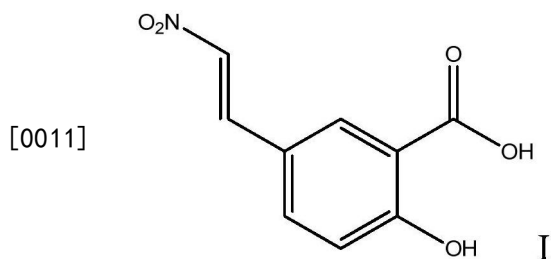
[0006] 或其药学上可接受的盐。

[0007] 在另一个实施方案中,本发明是治疗炎症相关病症的方法,该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效量的式I化合物:



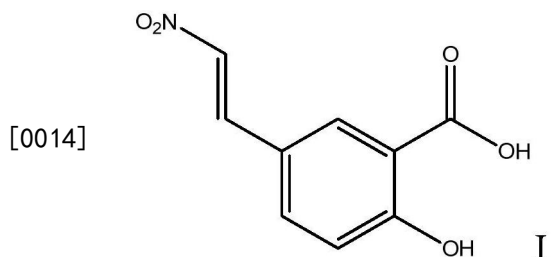
[0009] 或药学上可接受的盐,以及第二治疗剂。

[0010] 本发明范围内的一个实施方案是治疗组织同种异体移植排斥的方法,该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效量的式I化合物:



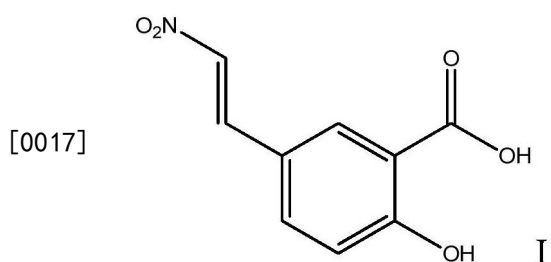
[0012] 或其药学上可接受的盐。

[0013] 在本发明范围内的另一个实施方案是治疗器官移植排斥的方法,该方法包括向需要其的受试者施用治疗有效量的式I化合物:



[0015] 或其药学上可接受的盐。

[0016] 在一个实施方案中,治疗器官移植排斥的方法包括治疗皮肤同种异体移植排斥,该治疗包括向需要其的受试者施用治疗有效量的式I化合物:



[0018] 或其药学上可接受的盐。

#### 附图说明

[0019] 图1显示SANA与β-巯基乙醇 (BME) 和谷胱甘肽 (GSH) 的加合物形成。

[0020] 图2显示SANA和BME之间的反应具有二级速率常数(second order rate constant)。

[0021] 图3表明SANA对THP-1巨噬细胞中LPS诱导的NF-κB/p65亚细胞定位的影响。

[0022] 图4显示SANA对人巨噬细胞中NF-κB依赖性基因表达的抑制。

[0023] 图5显示SANA是比水杨酸更有效的这些细胞中NF-κB依赖性基因表达的抑制剂。

[0024] 图6和图7显示SANA诱导第二阶段酶Nrf2/Keap1依赖性基因表达,但水杨酸不诱导。

[0025] 在图8和图9显示SANA抑制THP-1细胞中炎性体(炎性小体,inflammasome)分化成巨噬细胞(PMA 200nM,48小时),而水杨酸不诱导。

[0026] 图10显示SANA对体内AMPK磷酸化的影响。

[0027] 图11显示小鼠肝脏中SANA相比于水杨酸的pAMPK磷酸化水平,剂量水平为约100mg/kg至约300mg/kg。



[0028] 在图12中显示小鼠肝脏中SANA相比于水杨酸的pAMPK磷酸化水平,剂量水平为约100mg/kg至约400mg/kg。

[0029] 图13显示SANA在体内降低LPS诱导的IL-1 $\beta$ 分泌到腹膜中。

[0030] 图14显示SANA逆转HFD诱导的肥胖小鼠中的胰岛素抵抗。

[0031] 图15显示SANA出乎意料地不抑制GAPDH活性,而通常用硝基烯烃观察到抑制GAPDH活性。

[0032] 图16证明SANA处理的皮肤同种异体移植排斥比对照组更好。

[0033] 图17说明SANA处理的皮肤同种异体移植排斥比水杨酸更好。

### 具体实施方式

[0034] 在描述本发明的组合物和方法之前,应理解本发明不限于所描述的特定工艺、组合物或方法,因为它们可以变化。还应理解,说明书中使用的术语仅用于描述特定形式或实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料可用于实践或测试本发明的实施方案,但现在描述优选的方法、装置和材料。本文提及的所有出版物均通过引用整体并入。本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明而先于此类公开内容。

[0035] 还必须注意,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一种”和“该”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“细胞”是指一种或多种细胞及其本领域技术人员已知的等同物,等等。

[0036] 如本文所用,术语“约”是指使用其的数的数值加或减5%。因此,约50%意味着在45%-55%的范围内。

[0037] 当与治疗手段结合使用时,“施用”意指直接向受试者施用治疗药物,由此药剂积极地影响靶标。可以通过例如注射、口服施用、局部施用、或通过 these 方法与其它已知技术组合,来完成“施用”组合物。此类组合技术包括加热、辐射、超声和递送剂的使用。当化合物与一种或多种其它活性剂(例如其它抗动脉粥样硬化剂,诸如他汀类药物)组合提供时,“施用”及其变体各自被理解为包括同时和按顺序提供化合物或盐和其它药剂。

[0038] “药学上可接受的”是指载体、稀释剂、佐剂或赋形剂必须与制剂的其它成分相容并且对其接受者无害。

[0039] 如本文所用的“组合物”旨在涵盖包含特定量的特定成分的产品,以及直接或间接由特定量的特定成分的组合产生的任何产品。与“药物组合物”有关的术语旨在涵盖包含(一种或多种)活性成分以及构成载体的(一种或多种)惰性成分的产品,以及直接或间接由任何两种或更多种成分的组合、络合或聚集、或由一种或多种成分的解离、或由一种或多种成分的其它类型的反应或相互作用而产生的任何产品。因此,本发明的药物组合物涵盖通过混合本发明化合物和药学上可接受的载体而制备的任何组合物。

[0040] 如本文所用,术语“药剂”、“活性剂”、“治疗剂”或“治疗药物”是指用于治疗、防治、改善、预防或改善患者的不良病症或疾病的化合物或组合物。此外,术语“药剂”、“活性剂”、“治疗剂”或“治疗药物”包括一种或多种本发明化合物的组合。

[0041] 组合物的“治疗有效量”或“有效量”是预定量,其被计算以实现期望的效果,即抑制、阻断或逆转细胞功能的激活、迁移、增殖、改变,并保留细胞的正常功能。本文所述方法所考虑的活性包括适当的医学治疗和/或预防性治疗,并且本发明的组合物可用于提供所述任何病症的改善。还预期本文所述的组合物可以施用于健康受试者或没有表现出症状但可能有发展特定病症风险的个体。当然,根据本发明施用以获得治疗和/或预防效果的化合物的具体剂量将由围绕病例的特定情况确定,包括例如施用的化合物、施用途和正在接受的治疗。然而,应理解,所选择的剂量范围不旨在以任何方式限制本发明的范围。治疗有效量的本发明化合物通常是这样的量,使得当其以在生理学上可耐受的赋形剂组合物施用,足以在组织中实现有效的全身浓度或局部浓度。

[0042] 本文所用的术语“治疗”是指治疗性治疗以及防治性或预防性措施,其中目的是预防或减缓(减轻)不期望的生理状况、病症或疾病,或获得有益或期望的临床结果。出于本发明的目的,有益或期望的结果包括但不限于减轻症状;减轻病症、障碍或疾病的程度;病症、障碍或疾病状态的稳定(即不恶化);延迟发病或减缓病症、障碍或疾病的进展;改善病症、障碍或疾病状态;以及病症、障碍或疾病状态的缓解(无论是部分的还是全部的),无论是可检测的还是不可检测的,或增强或改善。治疗包括与如果不接受治疗的预期存活相比延长存活。

[0043] 如本文所用,术语“受试者”描述了可以施用根据本发明的组合物和化合物治疗的生物,包括哺乳动物。可以从所公开的方法中受益的哺乳动物物种包括但不限于猿、黑猩猩、猩猩、人、猴子;以及其它动物,诸如狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡、小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。通常,受试者是人。

[0044] 如本文所用,术语“组织”描述了通常具有特定种类的细胞聚集体以及其形成受试者的结构材料之一的细胞间物质。如本文所用,术语“器官”描述了执行特定功能的一组组织。例如,皮肤是本文所体现的一种器官。

[0045] 施用和组合物

[0046] 可以通过使活性剂与药剂的作用部位接触的方式,施用化合物及其药学上可接受的盐。它们可以通过与药物一起使用的常规方法施用,剂量范围为每天0.001至1000mg/kg哺乳动物(例如人)体重,单剂量或分剂量。一个剂量范围是每天口服0.01至500mg/kg体重,单剂量或分剂量。可以作为单独的治疗剂或以治疗剂的组合递送施用。它们可以单独施用,但通常与药学上可接受的赋形剂一起施用,基于所选施用途和标准药学实践选择该赋形剂。

[0047] 化合物可以通过一种或多种方式施用。例如,可以使用以下途径:口服、肠胃外(包括皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内注射或输注技术)、吸入、口腔、舌下或直肠,以含有有效量化合物的药物组合物的单位剂量的形式,以及任选地与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合,该赋形剂诸如稳定剂、抗氧化剂、润滑剂、填充剂(疏松剂)、填料、载体、佐剂、媒剂(vehicle)、稀释剂和其它在标准药学实践中熟知的赋形剂。

[0048] 适于口服施用的液体制剂(例如悬浮液、糖浆、酏剂和其它类似液体)可以使用介质,诸如水、二醇、油、醇等。适于口服施用的固体制剂(例如粉末、丸剂、胶囊和片剂)可以使用固体赋形剂、诸如淀粉、糖、高岭土、润滑剂、粘合剂、崩解剂、抗氧化剂等。

[0049] 肠胃外组合物通常使用无菌水作为载体和任选的其它成分,诸如溶解助剂。可以

例如使用包含盐水溶液、葡萄糖溶液、或含有盐水和葡萄糖的混合物的溶液的载体制备可注射溶液。《雷明顿：药理学与实践 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy)》，第21版 (Lippincott Williams & Wilkins, 2006) 中提供了适用于制备药物组合物的方法的进一步指导。

[0050] 治疗化合物可以口服施用，剂量范围为每天约0.001至1000mg/kg哺乳动物(例如人)体重，单剂量或分剂量。一个剂量范围是每天口服约0.01至500mg/kg体重，单剂量或分剂量。对于口服施用，组合物可以以片剂或胶囊的形式提供，其含有约1.0至500mg活性成分，特别是约1、5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500和750mg活性成分，用于对待治疗患者的剂量的症状调整。任何特定患者的具体剂量水平和剂量频率可以变化，并且取决于多种因素，包括所用特定化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和作用时间、年龄、体重、总体健康、性别、饮食、施用方式和时间、排泄率、药物组合、特定病症的严重程度以及接受治疗的宿主。鉴于影响特定剂量水平和频率的因素，预期剂量频率可以是多个每日剂量至每月剂量。优选的剂量频率范围从每天两次到每两周一次。更优选的剂量频率范围从每天两次到每周一次。最优选的剂量频率范围从一天两次到一周两次。

[0051] 在各种实施方案的方法中，包括活性剂的药物组合物可以以“有效量”施用于受试者。有效量可以是对患者提供有益效果的任何量，并且在特定实施方案中，有效量是可以：1) 防止受试者经历与施用的药剂相关的一种或多种副作用的量，诸如用于诊断、识别和治疗医学病症的那些，2) 减少受试者由于药物治疗而经历的副作用，或减少已知的由此类治疗产生的副作用的量，和/或3) 消除在施用活性剂之前受试者经历的药物治疗所产生的副作用或消除已知的由此类治疗产生的副作用的量。有效量可以进一步是为患者提供有益效果的任何量，并且在特定实施方案中，有效量是可以：1) 预防或减少组织同种异体移植排斥和/或2) 预防或减少移植器官排斥的量。

[0052] 含有本发明化合物和合适载体的药物制剂可以是各种形式，包括但不限于包括有效量的本发明的活性剂的固体、溶液、粉末、流体乳液、流体悬浮液、半固体和干粉。本领域还已知活性成分可与药学上可接受的稀释剂、填充剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、表面活性剂、疏水载体、水溶性载体、乳化剂、缓冲剂、增湿剂、保湿剂、增溶剂、抗氧化剂、防腐剂等一起包含在此类制剂中。用于施用的手段和方法是本领域已知的，并且技术人员可以参考各种药理学参考文献以获得指导。例如，可以参考《现代药剂学》(Modern Pharmaceutics)，Banker和Rhodes著，Marcel Dekker公司(1979)；Goodman和Gilman著，《治疗学的药理学基础(The Pharmaceutical Basis of Therapeutics)》，第6版，MacMillan出版社，纽约(1980)，这两篇文献都通过引用整体并入本文。

[0053] 本发明的其它实施方案包括如上所述制备的活性剂，其配制成用于口服施用的固体剂型，包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在此类实施方案中，活性化合物可以与一种或多种惰性稀释剂混合，诸如蔗糖、乳糖或淀粉。如在通常的实践中，此类剂型还可以包含除惰性稀释剂之外的其它物质，例如润滑剂，诸如硬脂酸镁。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，剂型还可以包含缓冲剂，并且可以另外用肠溶包衣制备。

[0054] 在另一个示例性实施方案中，可以将如上所述制备的活性剂的油性制剂冻干，以形成可与一种或多种药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合以形成片剂的固体，并且在另一个实施方案中，活性剂可以结晶以形成固体，该固体可以与药学上可接受的赋形剂、

载体或稀释剂组合以形成片剂。

[0055] 用于压片的装置和方法在本领域中是已知的,并且本领域普通技术人员可以参考各种参考文献以获得指导。例如,可以参考《药物制造手册:生产与工艺(Pharmaceutical Manufacturing Handbook:Production and Processes)》,Shayne Cox Gad,John Wiley& Sons出版社,新泽西州霍博肯(2008),其通过引用整体并入本文。

[0056] 可用于口服施用活性剂的其它实施方案包括液体剂型。在此类实施方案中,液体剂型可包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂,其含有本领域常用的惰性稀释剂,诸如水。此类组合物还可包含佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、以及甜味剂、调味剂和芳香剂。因此,例如,化合物可以用合适的聚合或疏水材料(例如,作为可接受油中的乳液)或离子交换树脂配制,或配制成微溶(sparingly soluble)衍生物,例如配制成微溶盐。其它合适的稀释剂包括但不限于下面描述的那些:

[0057] 植物油:如本文所用,术语“植物油”是指由植物油的乙氧基化形成的化合物或化合物的混合物,其中至少一条聚乙二醇链与植物油共价结合。在一些实施方案中,脂肪酸可具有约12个碳至约18个碳。在一些实施方案中,乙氧基化的量可以为约2至约200、约5至100、约10至约80、约20至约60、或约12至约18个乙二醇重复单元。植物油可以是氢化的或未氢化的。合适的植物油包括但不限于蓖麻油、氢化蓖麻油、芝麻油、玉米油、花生油、橄榄油、向日葵油、红花油、大豆油、苯甲酸苄酯、芝麻油、棉籽油和棕榈油。其它合适的植物油包括市售合成油,诸如但不限于Miglyol™ 810和812(可从瑞典的Dynamit Nobel化学公司获得)、Neobee™ M5(可从Drew化学公司获得)、Alofine™(可从Jarchem工业获得)、Lubritab™系列(可从JRS医药公司获得)、Sterotex™(可从Abitec公司获得)、Softisan™ 154(可从Sasol获得)、Croduret™(可从Croda获得)、Fancol™(可从Fanning公司获得)、Cutina™ HR(可从Cognis获得)、Simulsol™(可从CJ Petrow获得)、EmCon™ C0(可从Amisol公司获得)、Lipvol™ C0、SES和HS-K(可从Lipo获得)和Sterotex™ HM(可从Abitec公司获得)。其它合适的植物油,包括芝麻、蓖麻、玉米和棉籽油,包括R.C.Rowe和P.J.Shesky著《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(2006)第5版中列出的那些,其通过引用整体并入本文。合适的聚乙氧基化植物油包括但不限于Cremaphor™ EL或RH系列(可从BASF获得)、Emulphor™ EL-719(可从Stepan产品获得)和Emulphor™ EL-620P(可从GAF获得)。

[0058] 矿物油:如本文所用,术语“矿物油”是指未精制的和精制的(轻质)矿物油。合适的矿物油包括但不限于Avatech™等级(可从Avatar公司获得)、Drakeol™等级(可从Penreco获得)、Sirius™等级(可从Shell获得)和Citation™等级(可从Avater公司获得)。

[0059] 蓖麻油:如本文所用,术语“蓖麻油”是指由蓖麻油的乙氧基化形成的化合物,其中至少一条聚乙二醇链与蓖麻油共价结合。蓖麻油可以是氢化的或未氢化的。聚乙氧基化蓖麻油的同义词包括但不限于聚氧乙烯蓖麻油(polyoxyl castor oil)、氢化聚氧乙烯蓖麻油、聚乙二醇甘油蓖麻油酸酯(macrogolglyceroli ricinoleas)、聚乙二醇甘油羟基硬脂酸酯(macrogolglyceroli hydroxystearas)、聚氧乙烯35蓖麻油和聚氧乙烯40氢化蓖麻油。合适的聚乙氧基化蓖麻油包括但不限于Nikkol™ HCO系列(可从Nikko化学公司获得),诸如Nikkol HCO-30、HC-40、HC-50和HC-60(聚乙二醇-30氢化蓖麻油、聚乙二醇-40氢化蓖麻油、聚乙二醇-50氢化蓖麻油和聚乙二醇-60氢化蓖麻油);Emulphor™ EL-719(蓖麻油40摩尔乙氧基化物,可从Stepan产品获得);Cremophore™系列(可从BASF获得),其包括

Cremophore RH40、RH60和EL35 (分别为聚乙二醇-40氢化蓖麻油、聚乙二醇-60氢化蓖麻油和聚乙二醇-35氢化蓖麻油);以及Emulgin<sup>®</sup> RO和HRE系列(可从Cognis PharmaLine获得)。其它合适的聚氧乙烯蓖麻油衍生物包括R.C.Rowe和P.J.Shesky著《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(2006)第5版中列出的那些,其通过引用整体并入本文。

[0060] 甾醇:如本文所用,术语“甾醇”是指衍生自甾醇分子的乙氧基化的化合物或化合物的混合物。合适的聚乙氧基化甾醇包括但不限于PEG-24胆固醇醚,Solulan<sup>™</sup> C-24(可从Amerchol获得);PEG-30胆甾烷醇,Nikkol<sup>™</sup> DHC(可从Nikko获得);植物甾醇,GENEROL<sup>™</sup>系列(可从Henkel获得);PEG-25植物甾醇,Nikkol<sup>™</sup> BPSH-25(可从Nikko获得);PEG-5大豆甾醇,Nikkol<sup>™</sup> BPS-5(可从Nikko获得);PEG-10大豆甾醇,Nikkol<sup>™</sup> BPS-10(可从Nikko获得);PEG-20大豆甾醇,Nikkol<sup>™</sup> BPS-20(可从Nikko获得);以及PEG-30大豆甾醇,Nikkol<sup>™</sup> BPS-30(可从Nikko获得)。

[0061] 聚乙二醇:如本文所用,术语“聚乙二醇”或“PEG”是指含有式-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-的乙二醇单体单元的聚合物。合适的聚乙二醇可以在聚合物分子的每个末端具有游离羟基,或者可以具有一个或多个用低级烷基(例如甲基)醚化的羟基。同样合适的是具有可酯化羧基的聚乙二醇的衍生物。可用于本发明的聚乙二醇可以是任何链长或分子量的聚合物,并且可以包括支化。在一些实施方案中,聚乙二醇的平均分子量为约200至约9000。在一些实施方案中,聚乙二醇的平均分子量为约200至约5000。在一些实施方案中,聚乙二醇的平均分子量为约200至约900。在一些实施方案中,聚乙二醇的平均分子量为约400。合适的聚乙二醇包括但不限于聚乙二醇-200、聚乙二醇-300、聚乙二醇-400、聚乙二醇-600和聚乙二醇-900。名称中的短划线后面的数字是指聚合物的平均分子量。在一些实施方案中,聚乙二醇是聚乙二醇-400。合适的聚乙二醇包括但不限于Carbowax<sup>™</sup>和Carbowax<sup>™</sup> Sentry系列(可从Dow获得),Lipoxol<sup>™</sup>系列(可从Brenntag获得),Lutrol<sup>™</sup>系列(可从BASF获得)和Pluriol<sup>™</sup>系列(可从BASF获得)。

[0062] 丙二醇脂肪酸酯:如本文所用,术语“丙二醇脂肪酸酯”是指在丙二醇或聚丙二醇与脂肪酸之间形成的单酯或二酯、或其混合物。可用于衍生丙二醇脂肪醇醚的脂肪酸包括但不限于本文定义的那些。在一些实施方案中,单酯或二酯衍生自丙二醇。在一些实施方案中,单酯或二酯具有约1至约200个氧丙烯单元。在一些实施方案中,分子的聚丙二醇部分具有约2至约100个氧丙烯单元。在一些实施方案中,单酯或二酯具有约4至约50个氧丙烯单元。在一些实施方案中,单酯或二酯具有约4至约30个氧丙烯单元。合适的丙二醇脂肪酸酯包括但不限于丙二醇月桂酸酯:Lauroglycol<sup>™</sup> FCC和90(可从Gattefosse获得);丙二醇辛酸酯:Capryol<sup>™</sup> PGMC和90(可从Gattefosse获得);以及丙二醇二辛酸酯/二癸酸酯:Labrafac<sup>™</sup> PG(可从Gattefosse获得)。

[0063] 硬脂酰聚乙二醇甘油酯:硬脂酰聚乙二醇甘油酯是指主要由硬脂酸合成或主要由硬脂酸衍生的化合物合成的聚乙二醇化甘油酯,尽管其它脂肪酸或衍生自其它脂肪酸的化合物也可用于合成。合适的硬脂酰聚乙二醇甘油酯包括但不限于Gelucire<sup>®</sup> 50/13(可从Gattefosse获得)。

[0064] 在一些实施方案中,稀释剂组分包含甘露醇、乳糖、蔗糖、麦芽糖糊精、山梨糖醇、木糖醇、粉状纤维素、微晶纤维素、羧甲基纤维素、羧乙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、

羟乙基纤维素、甲基羟乙基纤维素、淀粉、羟基乙酸淀粉钠(羧甲淀粉钠)、预胶化淀粉、磷酸钙、金属碳酸盐、金属氧化物或金属铝硅酸盐中的一种或多种。

[0065] 用于固体和/或液体剂型的示例性赋形剂或载体包括但不限于：

[0066] 山梨糖醇：合适的山梨糖醇包括但不限于PharmSorbide E420(可从Cargill获得)、Liponic 70-NC和76-NC(可从Lipo化学公司获得)、Neosorb(可从Roquette获得)、Partech SI(可从Merck获得)和Sorbogem(可从SPI Polyols获得)。

[0067] 淀粉、羟基乙酸淀粉钠和预胶化淀粉包括但不限于R.C.Rowe和P.J.Shesky著《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(2006)第5版中列出的那些，其通过引用整体并入本文。

[0068] 崩解剂：崩解剂可包括交联羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、交聚维酮、海藻酸、海藻酸钠、海藻酸钾、海藻酸钙、离子交换树脂、基于食用酸和碱性碳酸盐组分的泡腾体系、粘土、滑石、淀粉、预胶化淀粉、羟基乙酸淀粉钠、纤维素絮状物(cellulose floc)、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、硅酸钙、金属碳酸盐、碳酸氢钠、柠檬酸钙或磷酸钙中的一种或多种。

[0069] 本发明的其它实施方案包括与其它活性剂组合施用的活性剂，诸如，例如佐剂、蛋白酶抑制剂或其它相容的药物或化合物，其中此类组合被认为对实现本文所述方法的期望效果是理想的或有利的。

[0070] 本发明的其它实施方案包括药物组合物，该药物组合物包含有效量的活性剂以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。其它实施方案包括药物组合物，该药物组合物包含有效量的活性剂的药学上可接受的盐。其它实施方案包括药物组合物，该药物组合物包含有效量的活性剂的药学上可接受的盐以及药学上可接受的赋形剂。

[0071] 在其它实施方案中，活性剂可以与一种或多种第二治疗剂组合。第二治疗剂可包括但不限于：抗血小板药物、血管紧张素II抑制剂、ACE抑制剂、Ca<sup>++</sup>通道阻滞剂、胰岛素增敏剂、HMG-CoA还原酶抑制剂、β阻滞剂、非甾体抗炎药、甾体抗炎药、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)调节剂及其组合。

[0072] 如本文所述的多能抗炎和代谢调节剂及其药物组合物可以施用于受试者以治疗许多急性和慢性炎症和代谢病症。在一些实施方案中，如本文所述的多能抗炎和代谢调节剂及其药物组合物可用于治疗急性病症，包括一般炎症、自身免疫疾病、自身炎症疾病、动脉狭窄、器官移植排斥和烧伤、以及慢性病症，该慢性病症诸如慢性肺损伤和呼吸窘迫、糖尿病、高血压、肥胖症、关节炎、神经退行性疾病和各种皮肤病。

[0073] 然而，在其它实施方案中，如本文所述的多能抗炎和代谢调节剂及其药物组合物可用于治疗具有包括慢性或急性炎症的症状的任何病症，诸如，例如关节炎、狼疮、莱姆病、痛风、败血症、体温过高、溃疡、小肠结肠炎、骨质疏松症、病毒或细菌感染、巨细胞病毒、牙周病、肾小球肾炎、结节病、肺病、肺部炎症、肺纤维化、哮喘、后天性呼吸窘迫综合征(acquired respiratory distress syndrome)、烟草诱发的肺病、肉芽肿形成、肝纤维化、移植抗宿主病、术后炎症、血管成形术后冠状动脉和外周血管再狭窄、支架置入或旁路移植、冠状动脉旁路移植术(CABG)、急性和慢性白血病、B淋巴细胞白血病、肿瘤性疾病、动脉硬化、动脉粥样硬化、心肌炎症、银屑病、免疫缺陷、弥散性血管内凝血、系统性硬化、肌萎缩侧索硬化、多发性硬化、帕金森病、阿尔茨海默病、脑脊髓炎、水肿、炎症性肠病、高免疫球蛋白

白E综合征 (hyper IgE syndrome)、癌症转移或生长、过继性免疫治疗、再灌注综合征、放射性烧伤、脱发等。

[0074] 如本文所述的式I化合物及其药物组合物可以施用于受试者以治疗组织同种异体移植排斥。在其它实施方案中,可将如本文所述的式I化合物及其药物组合物施用于受试者以预防或减少移植器官的排斥。在一些实施方案中,如本文所述的式I化合物及其药物组合物可用于延长移植组织的存活。在一些实施方案中,如本文所述的式I化合物及其药物组合物可用于延长移植器官的存活。

#### [0075] 实施例

[0076] 以下实施例包含制备式I化合物的详细方法。这些详细描述用于举例说明构成本发明一部分的上述一般合成方案。提供这些详细描述仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。除非另有说明,否则所有份数均以重量计,温度均为摄氏度。所有化合物显示出与其指定结构一致的NMR谱。

#### [0077] 实施例1:2-羟基-5-(2-硝基乙烯基) 苯甲酸 (SANA)

[0078] 向5-甲酰水杨酸 (1g, 6.02mmol) 的乙醇 (16.5mL) 溶液中加入硝基甲烷 (5.5mL, 0.10mmol) 和乙酸铵 (1.39g, 18.06mmol)。将反应混合物在60℃加热1小时,冷却至室温并放入冰箱15分钟。将形成的橙色沉淀滤出并溶于水 (约250mL) 中。用浓HCl (约10滴) 酸化溶液直至全部沉淀。滤出形成的黄色固体并真空干燥。产量:1.18g (93%)。

[0079]  $^1\text{H}$  NMR (丙酮- $d_6$ ):  $\delta$  = 8.35 (d,  $J$  = 2.3Hz, 1H), 8.14 (d,  $J$  = 13.7, 1H), 8.06 (dd,  $J$  = 8.7 2.3Hz, 1H), 7.99 (d,  $J$  = 13.7Hz, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 8.7Hz, 1H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (丙酮- $d_6$ ):  $\delta$  = 171.09, 164.66, 137.94, 136.51, 135.94, 133.21, 121.95, 118.51, 113.08

#### [0080] 生物活性

[0081] 所描述的以下方法用于证明生物活性和治疗用途,不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

#### [0082] 体外活性

[0083] 如图1所示,将磷酸盐缓冲液100mM, pH7.4中的SANA (100mM) 与 $\beta$ -巯基乙醇 (BME) (1mM) 或谷胱甘肽 (GSH) (1mM) 一起温育,并用分光光度法跟踪反应 (每1分钟扫描1次,长达15分钟)。通过Varian Cary 50 Bio获得UV-可见光谱。每分钟进行扫描,长达15分钟。

[0084] SANA和BME或GSH之间的反应显示在360nm波长处的吸收增加。360nm处的增加表明SANA与BME或GSH之间形成加合物。

[0085] 在图2中,显示SANA和BME之间的反应被确定为二级速率常数 (second order rate constant)。使用Rx 2000停流分析仪 (Applied Photophysics) 进行停流动力学测量。150 $\mu\text{L}$  NATx0 (25 $\mu\text{M}$ ) 与0.54mM、1.09mM、1.64mM、2.18mM和2.73mM浓度的BME溶液的混合物。

[0086] 通过跟踪260nm处的吸光度监测反应,并使用Originlab软件 (版本8.0) 将图拟合成简单的指数衰减函数。从该等式中提取在每种BME浓度下观察到的伪一级常数 (准一级常数),并相对于BME的浓度作图。反应的第二速率常数来自曲线的斜率,并且是 $182 \pm 6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。所有实验均在25℃下一式三份进行。

[0087] 核因子 $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) 代表存在于所有真核细胞中的促炎转录因子家族,其调节参与免疫应答和细胞周期调节的广泛基因的可诱导表达。NF- $\kappa\text{B}$ 的活化伴随着NF- $\kappa\text{B}$ 的核转位。因此,图3表明在SANA存在下缺乏NF- $\kappa\text{B}$ 的核转位以进一步证明其抗炎作用。具体地,图3说

明:免疫荧光和落射荧光显微镜分析显示SANA对THP-1巨噬细胞中LPS诱导的NF- $\kappa$ B/p65亚细胞定位的影响。出乎意料的是,在用LPS (1 $\mu$ g/mL) 活化之前,用浓度为0.1mM的SANA处理细胞2小时,显示出与用1mM水杨酸处理的细胞相同的效果。该数据表明SANA比水杨酸显著更有效。

[0088] 图4显示SANA对人巨噬细胞中NF- $\kappa$ B依赖性基因表达的抑制。THP-1细胞分化为巨噬细胞。然后用SANA (100和200 $\mu$ M) 或水杨酸 (SA:100和200 $\mu$ M) 处理细胞2小时。然后用LPS (1mg/mL,3小时) 刺激细胞。提取mRNA并通过qPCR定量IL-6、TNF- $\alpha$ 和MCP-1与对照相比的倍数变化基因表达。有趣的是,图4显示当在相同浓度下使用时,SA不能抑制这些细胞中NF- $\kappa$ B依赖性基因表达。

[0089] 在图5中,用/不用SANA (0,50;100和200 $\mu$ M,2小时) 或SA (1mM) 处理鼠RAW 264.7巨噬细胞,以观察在鼠巨噬细胞中NF- $\kappa$ B依赖性基因表达的潜在抑制。然后用LPS (50ng/mL,16小时) 刺激细胞。收集上清液并通过ELISA测量IL-6。我们使用Bonferroni post-host进行单向ANOVA统计检验。(\*) :与LPS-DMSO相比 $p < 0.05$ 。图5显示SANA是比SA更有效的这些细胞中NF- $\kappa$ B依赖性基因表达的抑制剂。

[0090] 图6和图7显示SANA诱导第二阶段酶Nrf2/Keap1依赖性基因表达,但SA不诱导。用SANA (0.1mM) 或水杨酸 (0.2和5mM) 处理Hep G2细胞5小时。从细胞中提取mRNA,并通过qPCR测量HO-1、GCLM和NQO1基因表达。

[0091] 在图8和图9中显示当与第一(图8) 或第二(图9) 信号一起施用, SANA抑制THP-1细胞中的炎性体分化为巨噬细胞 (PMA 200nM,48小时), 而SA不抑制。在图8中,细胞用水杨酸 (0.25mM) 或SANA (0.05;0.125和0.25) 与LPS刺激一起处理。用LPS (250ng/mL,3小时) 刺激细胞,然后用ATP (5mM,45分钟) 刺激细胞。收集上清液并通过ELISA测量IL-1 $\beta$ 。通过MTT测定评估细胞活力。值显示为平均值 $\pm$ SD。

[0092] 在图9中,THP-1细胞用PMA (200nM,48小时) 分化成巨噬细胞。用LPS (250ng/mL,3小时) 刺激细胞,然后用ATP (5mM,45分钟) 刺激细胞。与ATP处理一起,然后用NATxME (10 $\mu$ M)、水杨酸 (0.25mM) 或SANA (0.05;0.125和0.25mM) 处理细胞。收集上清液并通过ELISA测量IL-1 $\beta$ 分泌。通过MTT测定评估细胞活力。值显示为平均值 $\pm$ SD。图8和图9显示当与第一或第二信号一起施用, SANA是炎性体的有效抑制剂,而SA不能抑制这种有效的促炎细胞途径。

[0093] 体内活性

[0094] 图10显示SANA对体内AMPK磷酸化的影响。用SANA (200mg/kg,管饲) 或PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 76mM;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 24mM;NaCl 17mM pH 7.4) 处理C57BL/6小鼠。施用1小时后,提取肝脏,然后均化到NETN裂解缓冲液中。然后通过Western印迹检测pAMPK。在两只小鼠 (n=2) 中研究每种条件。

[0095] 在图11中,用SANA或SA (100、200和300mg/kg,腹膜内) 或PBS, pH 7.4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 76mM;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 24mM;NaCl 17mM) 处理C57BL/6小鼠。施用2小时后,提取肝脏,然后均化到NETN裂解缓冲液中。然后通过蛋白质印迹检测pAMPK。在一只小鼠 (n=1) 中研究每种条件。

[0096] 在图12中,C57BL/6小鼠用SANA处理直至400mg/kg腹膜内或PBS, pH 7.4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 76mM;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 24mM;NaCl 17mM) 。施用2小时后,提取肝脏,然后均化到NETN裂解缓冲液中。然后通过蛋白质印迹检测pAMPK。在一只小鼠 (n=1) 中研究每种条件。

[0097] 图13显示SANA在体内降低LPS诱导的IL-1 $\beta$ 分泌到腹膜中。



[0098] 图14显示SANA逆转HFD诱导的肥胖小鼠中的胰岛素抵抗。在四周期间,每天用SANA (100mg/kg;管饲)或磷酸盐缓冲液(对照)处理HFD下小鼠长达7个月(平均体重约40g)。根据众所周知的标准程序进行葡萄糖耐量试验。

[0099] 图15显示SANA出乎意料地不抑制GAPDH活性,而用硝基烯烃通常观察到抑制GAPDH活性。

[0100] 如图16所示,与对照组相比,向受试者施用SANA证明移植皮肤的存活延长。用来自C57BL/6雄性小鼠尾巴的皮肤移植C57BL/6雌性小鼠。皮肤移植是一个小方块(1cm<sup>2</sup>),并将其植入雌性小鼠的左肩胛下区域。从移植前一天到其后15天,每天用SANA (100mg/kg,通过经口管饲法;SANA组)或媒剂(对照组)处理小鼠。使用的媒剂(载体,vehicle)是羧甲基纤维素0.5%<sub>m/v</sub>和吐温80 0.5%<sub>v/v</sub>的溶液。在施用第15天结束时,每48/72小时检查同种异体移植以评估移植皮肤的状态。当同种异体移植损失超过其尺寸的50%和/或超过10%的同种异体移植坏死时,临床诊断为排斥。

[0101] 图17的结果表明,与水杨酸相比,用SANA处理使皮肤同种异体移植排斥显著降低。该研究遵循上文针对图1描述的方案,但进一步包括水杨酸盐组。用来自C57BL/6雄性小鼠尾巴的皮肤移植C57BL/6雌性小鼠。皮肤移植是一个小方块(1cm<sup>2</sup>),并将其植入雌性小鼠的左肩胛下区域。从移植前一天到术后15天,每天用水杨酸盐(100mg/kg,经口管饲法;水杨酸盐组)、SANA (100mg/kg,经口管饲法;SANA组)或媒剂(对照组)处理小鼠。使用的媒剂是羧甲基纤维素0.5%<sub>m/v</sub>和吐温80 0.5%<sub>v/v</sub>的溶液。在施用第15天结束时,每48/72小时检查同种异体移植以评估移植皮肤的状态。当同种异体移植损失超过其尺寸的50%和/或超过10%的同种异体移植坏死时,临床诊断为排斥。

[0102] 非专利引文

[0103] 1.Manabe,I.《慢性炎症联系心血管、代谢和肾脏疾病(Chronic Inflammation Links Cardiovascular, Metabolic and Renal Diseases)》,Circ J.75(12):2739-48 (2011)。

[0104] 2.Antman,EM等人.《使用非甾体类抗炎药:临床医生的最新情况:来自美国心脏协会的科学声明(Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs:an update for clinicians:a scientific statement from the American Heart Association)》,Circulation 115(12):1634-42(2007年3月27日)。

SANA亲电子反应性

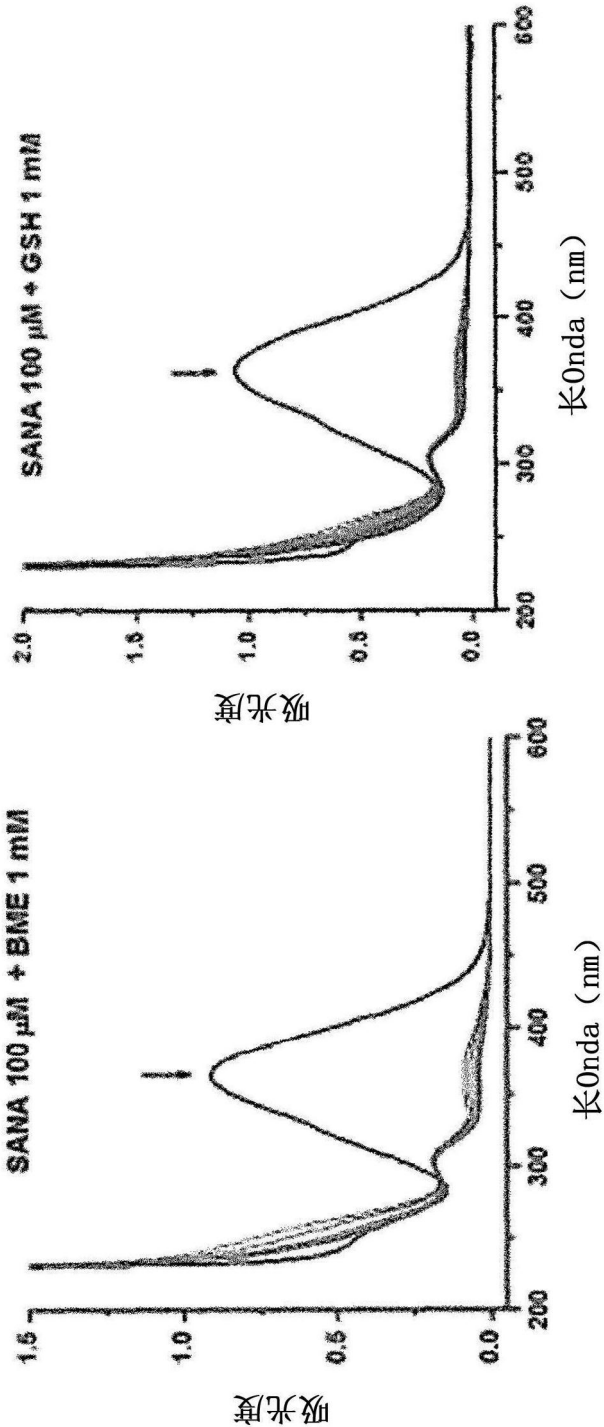


图1

SANA亲电子反应性

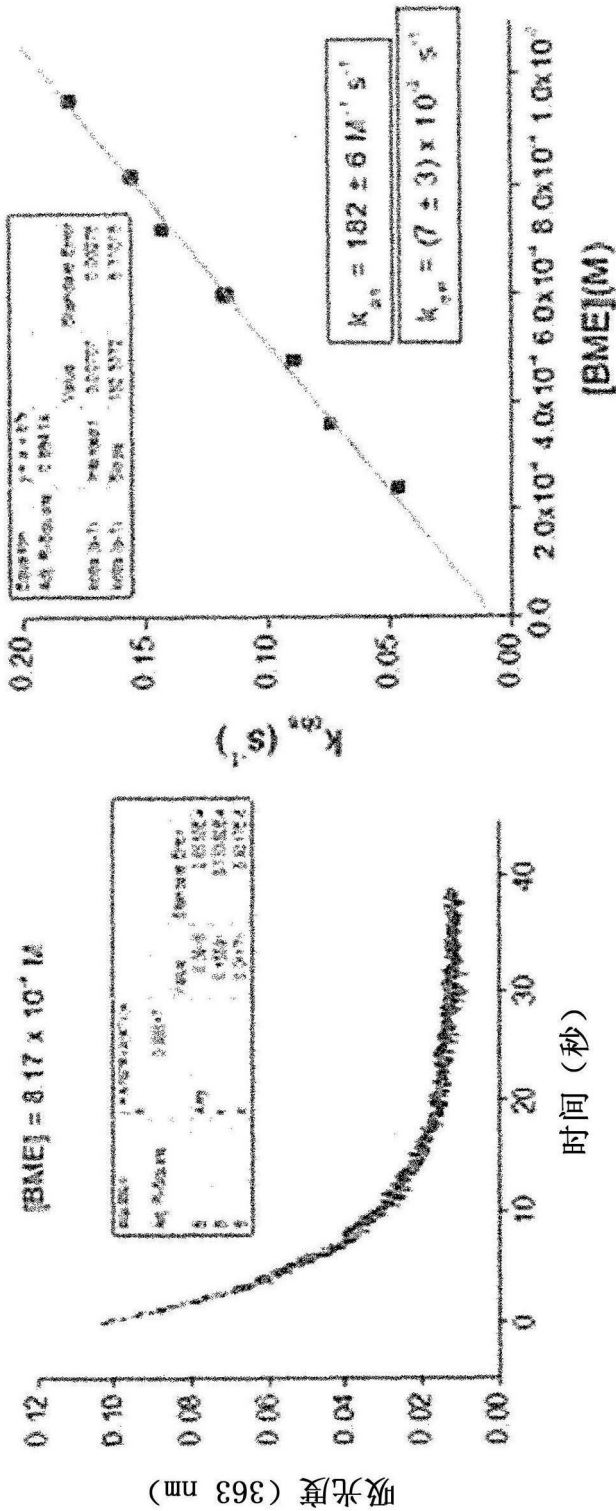


图2

SANA以小于SA 10倍的浓度抑制THP-1细胞中LPS诱导的NF- $\kappa$ B/p65的核转位

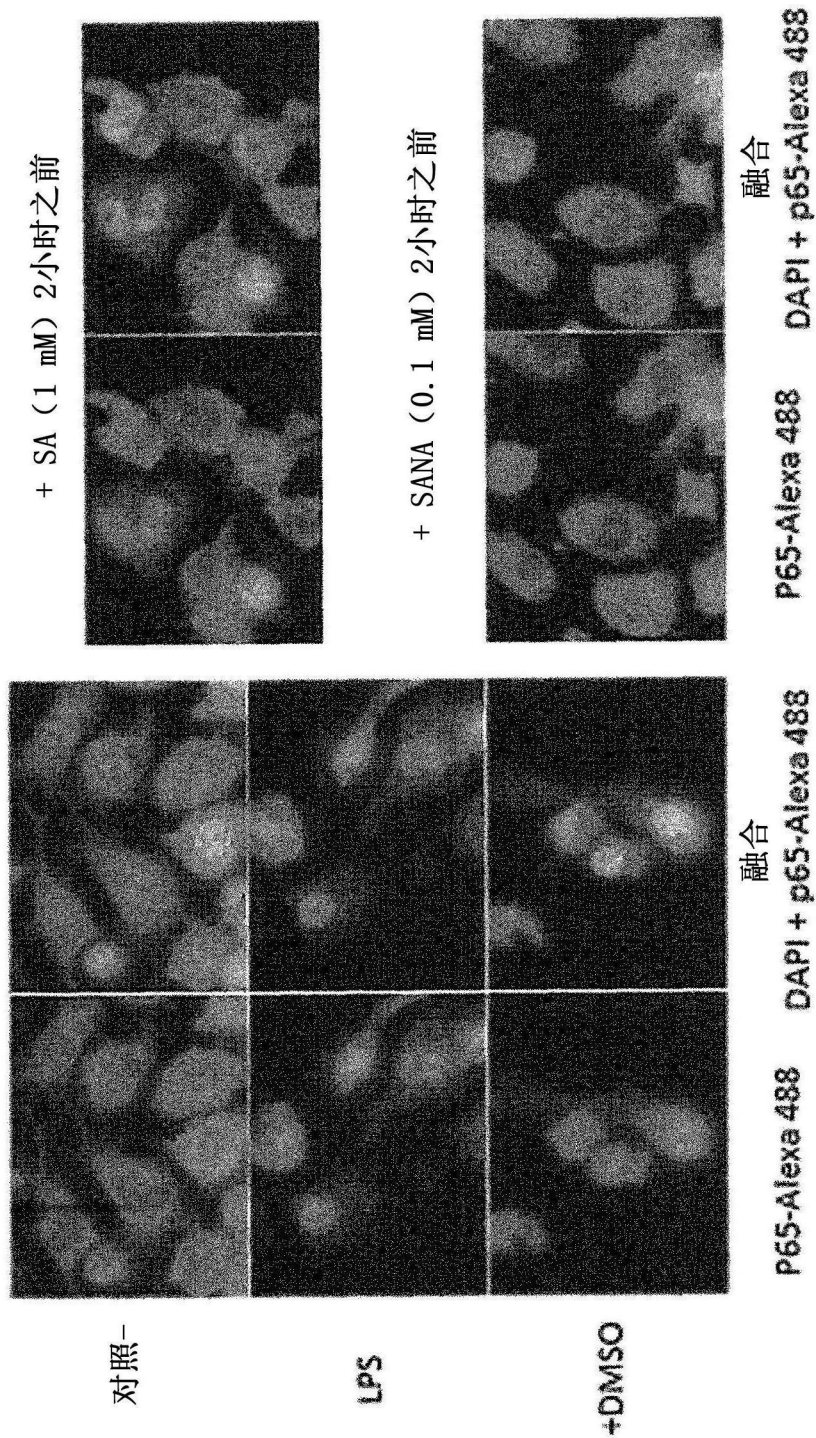


图3

SANA抑制THP-1细胞中LPS诱导的NF- $\kappa$ B依赖性基因表达

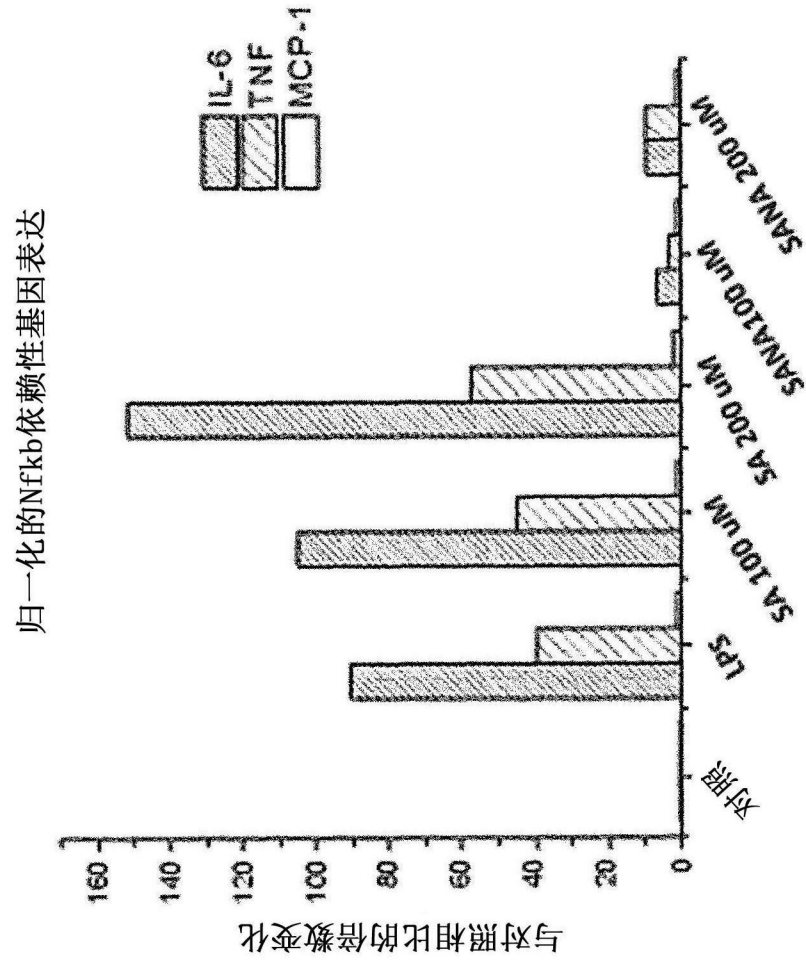


图4

SANA抑制RAW 264.7细胞中LPS诱导的NF- $\kappa$ B依赖性IL-6分泌

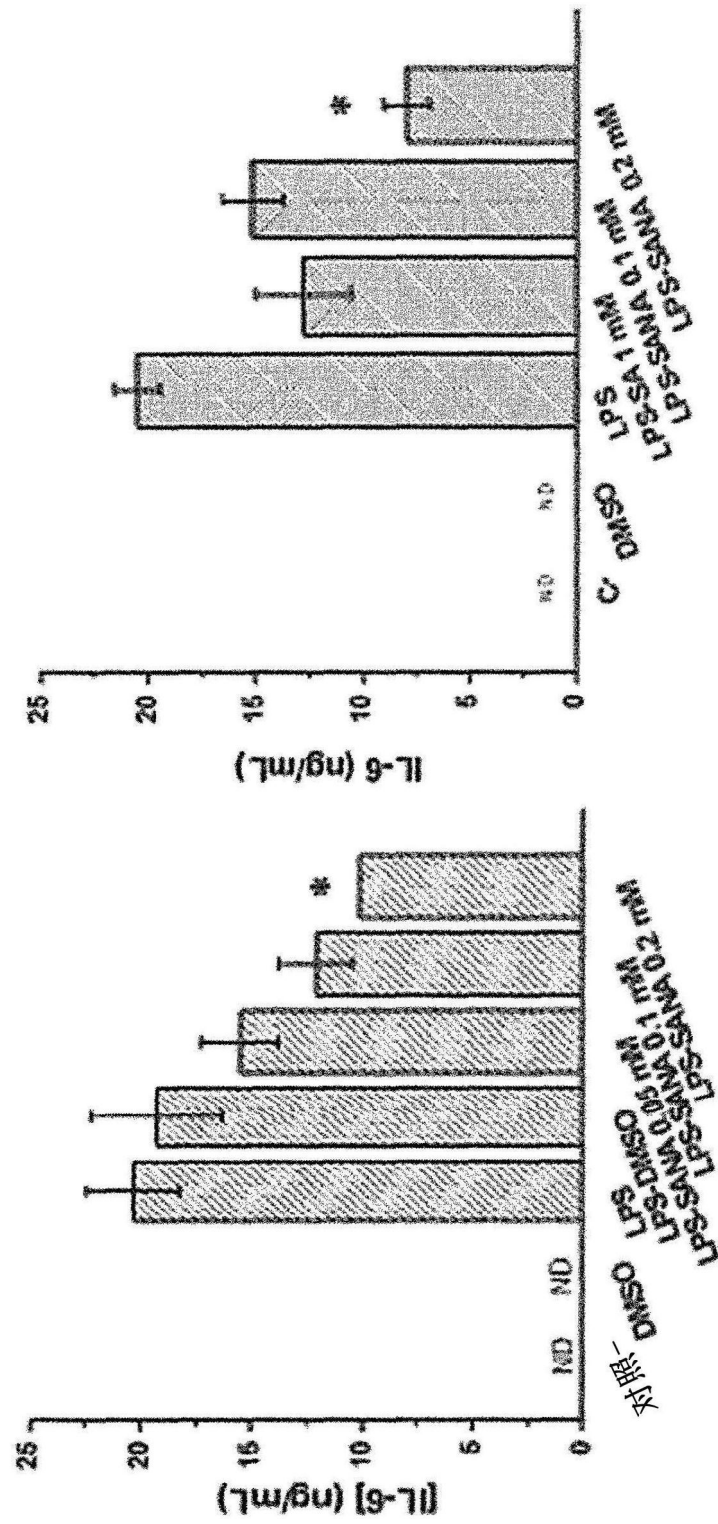


图5

SANA诱导人肝脏细胞 (Hep G2) 中Nrf2/Keap1依赖性基因表达

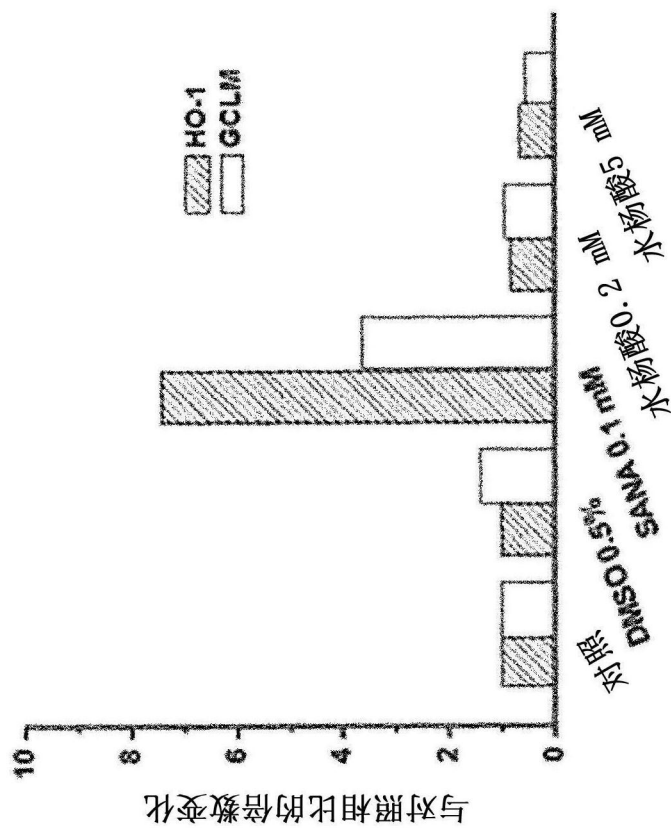


图6

图X. 第二阶段酶Nrf2/Keap1依赖性基因表达。用SANA (0.1mM) 或水杨酸 (0.2和5 mM) 处理Hep G2细胞5小时。从细胞中提取mRNA, 并通过qPCR测量HO-1、GCLM和NQO1基因表达。

SANA诱导人肝脏细胞（Hep G2）中Nrf2/Keap1依赖性基因表达

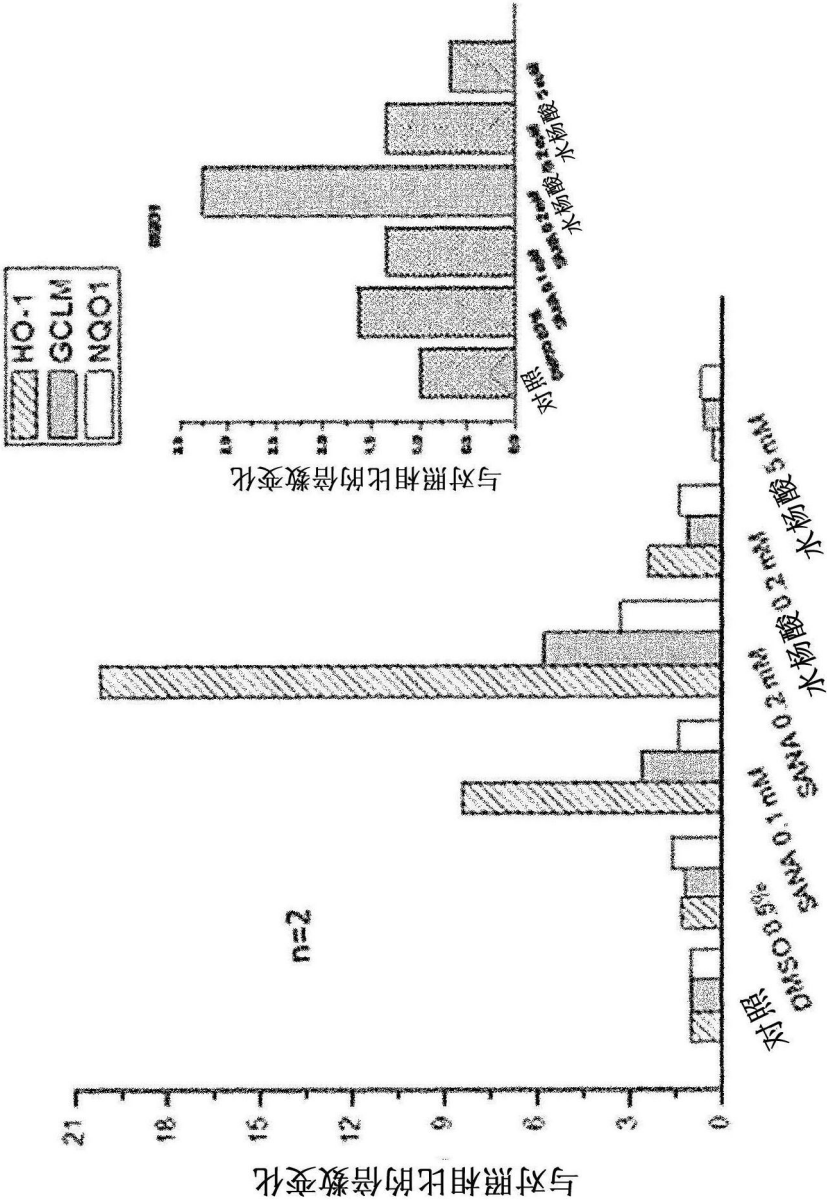


图7



通过SANA的炎性调控  
在第一信号处施用的化合物

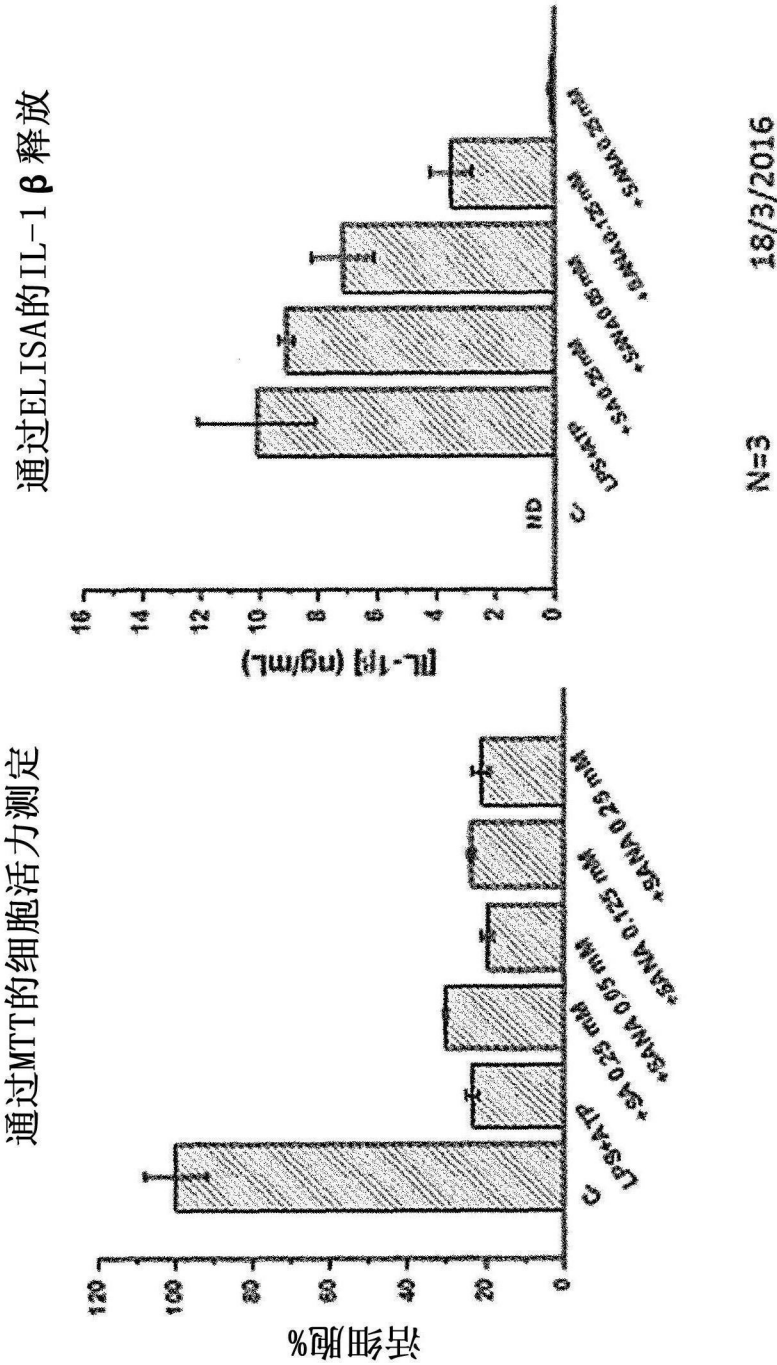


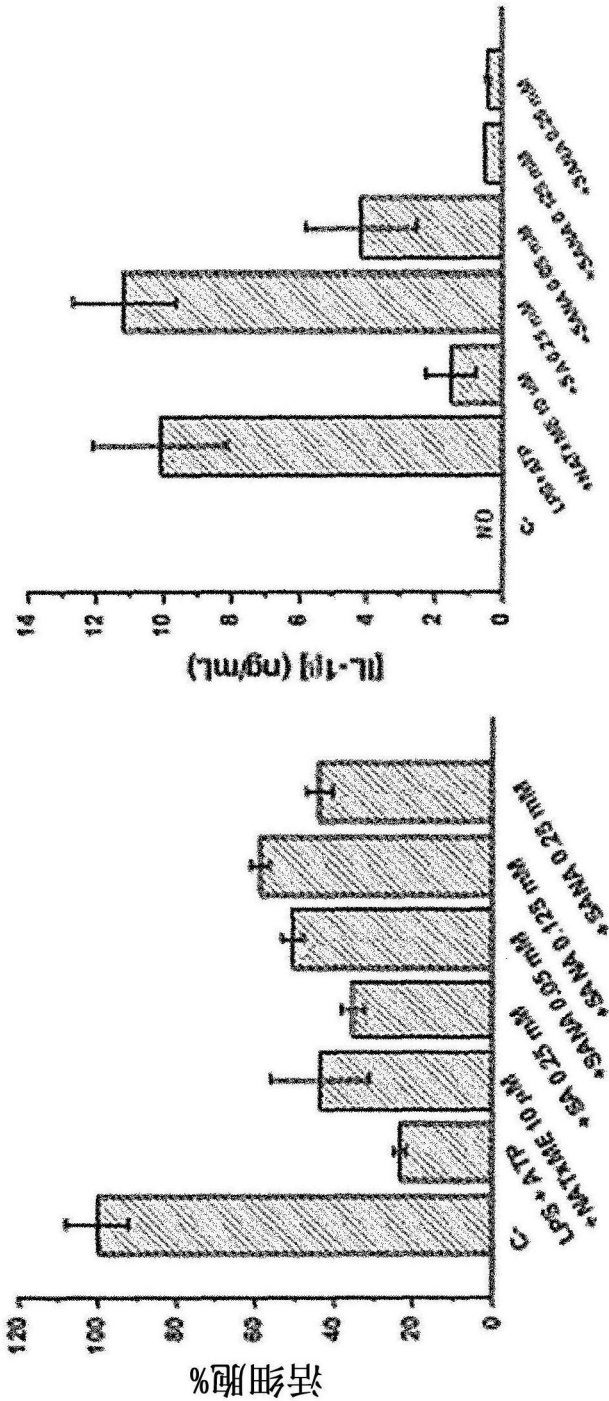
图8

通过SANA的炎性体调控

在第二信号处施用的硝基烯烃

通过ELISA的IL-1 $\beta$  释放

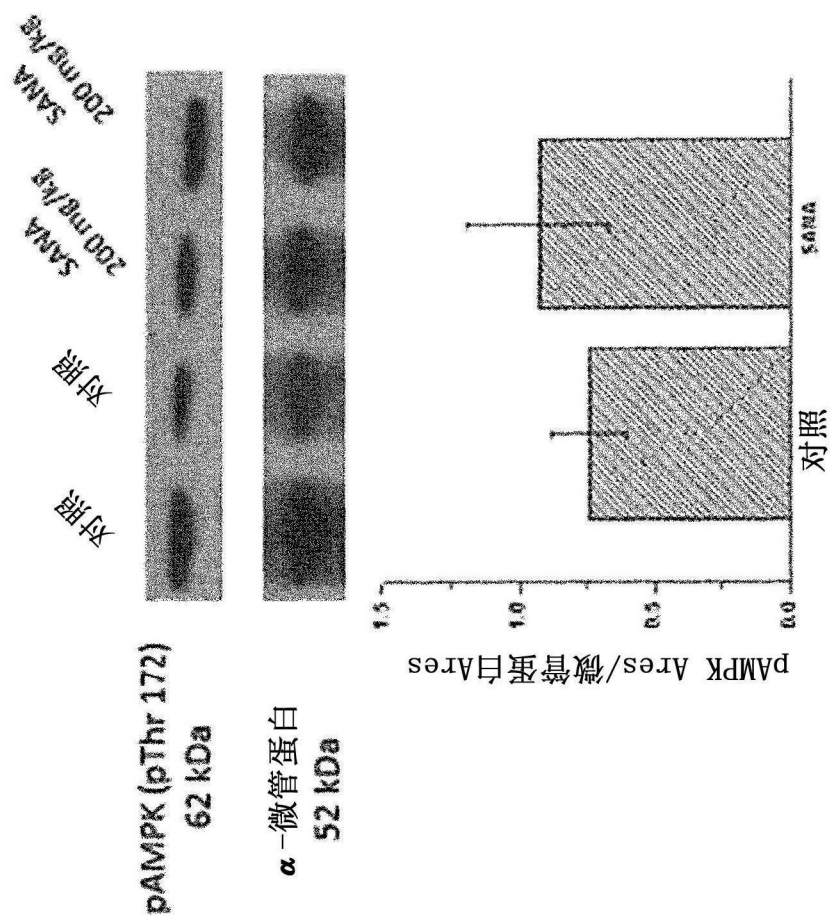
通过MTT的细胞活力测定



N=3 18/3/2016

图9

## 用SANA处理的小鼠中检测活性AMPK



图X. SANA对体内AMPK磷酸化的影响。用SANA (200 mg/kg, 管饲) 或PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 76mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 24 mM; NaCl 17mM pH 7.4) 处理C57BL/6小鼠。施用1小时后, 提取肝脏, 然后均化到NETN裂解缓冲液中。然后通过Western印迹检测pAMPK。在两只小鼠 (n=2) 中研究每种条件。

图10

用SANA或水杨酸处理的小鼠中的pAMPK检测

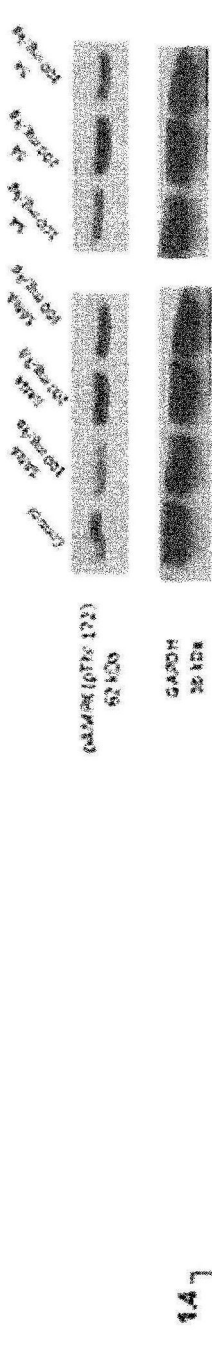


图11

图X. SANA对体内AMPK磷酸化的影响。  
用SANA (100、200和300 mg/kg, 腹膜内) 或PBS, pH 7.4 (Na2HPO4 76 mM; NaH2PO4 24 mM; NaCl 17 mM) 处理C57BL/6小鼠。施用2小时后, 提取肝脏, 然后均化到NETN裂解缓冲液中。然后通过蛋白质印迹检测pAMPK。在一只小鼠 (n=1) 中研究每种条件。

用SANA或水杨酸处理的小鼠中的pAMPK检测

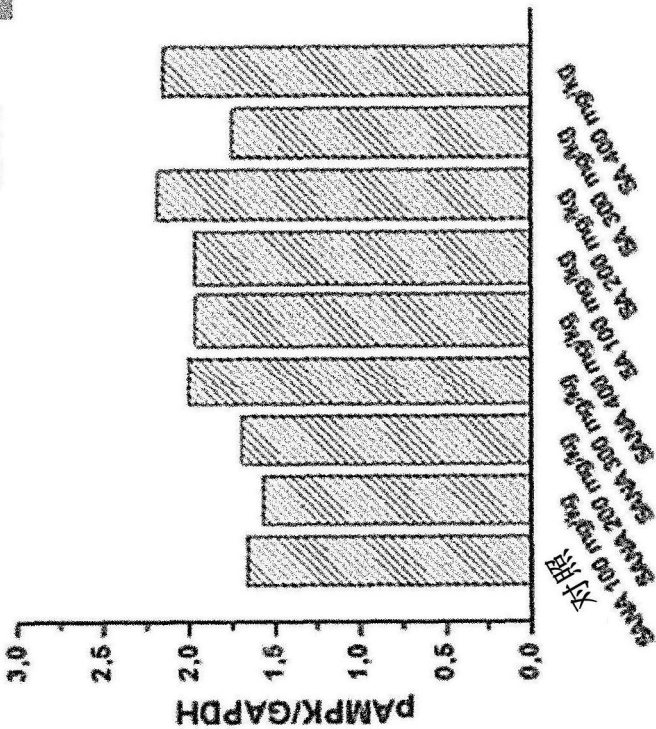
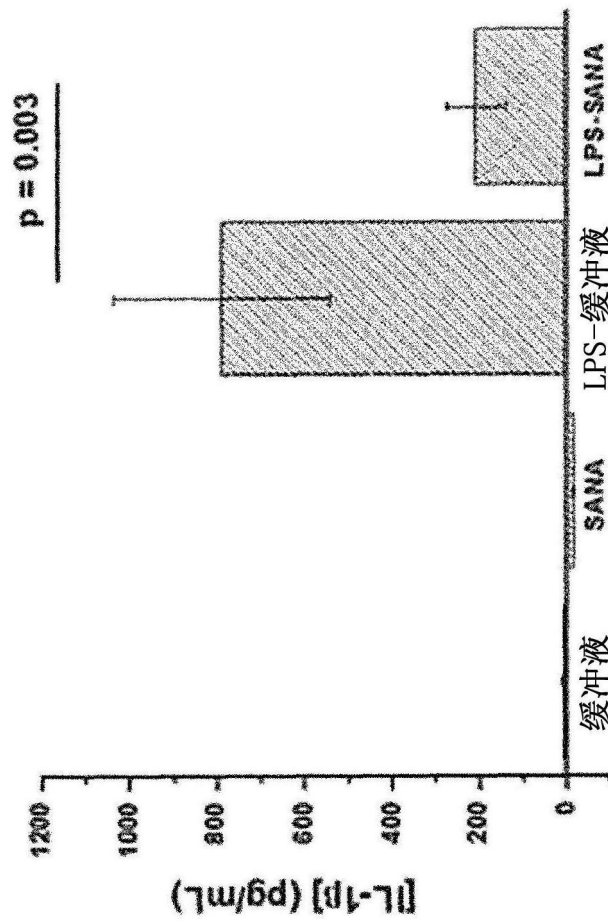


图12

图X. SANA对体内AMPK磷酸化的影响。  
C57BL/6小鼠用SANA  
(100、200和300 mg/kg, 腹腔内)  
或PBS, pH 7.4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 76 mM;  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 24 mM; NaCl 17 mM)  
处理。施用2小时后, 提取肝脏,  
然后均化到NETN裂解缓冲液中。  
然后通过蛋白质印迹检测pAMPK。  
在一只小鼠 (n=1) 中研究  
每种条件。

SANA在体内降低LPS诱导的IL-1 $\beta$ 分泌到腹膜中

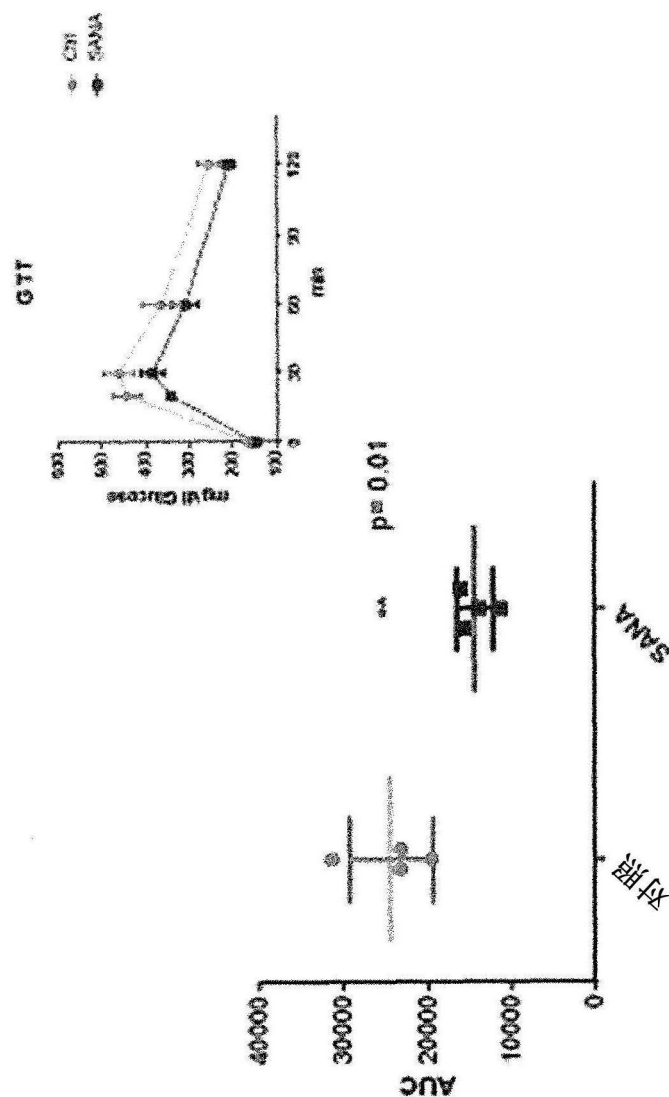


LPS (腹膜内10 mg/kg)

SANA (腹膜内100 mg/kg; LPS施用前2小时)

图13

### SANA逆转HFD诱导的肥胖小鼠的胰岛素抵抗抗



葡萄糖耐量试验。在四周期间，每天用SANA（100mg/kg；管饲）或磷酸盐缓冲液（对照）处理HFD下小鼠长达7个月（平均体重约40g）。正常进行GTT。  
注意：治疗前葡萄糖耐量试验显示组间没有差异

图14

# SANA不抑制GAPDH活性，而其他硝基烯烃会抑制

Geethapriya, C. et al; J Biol Chem 2005, 280:20450-20453.

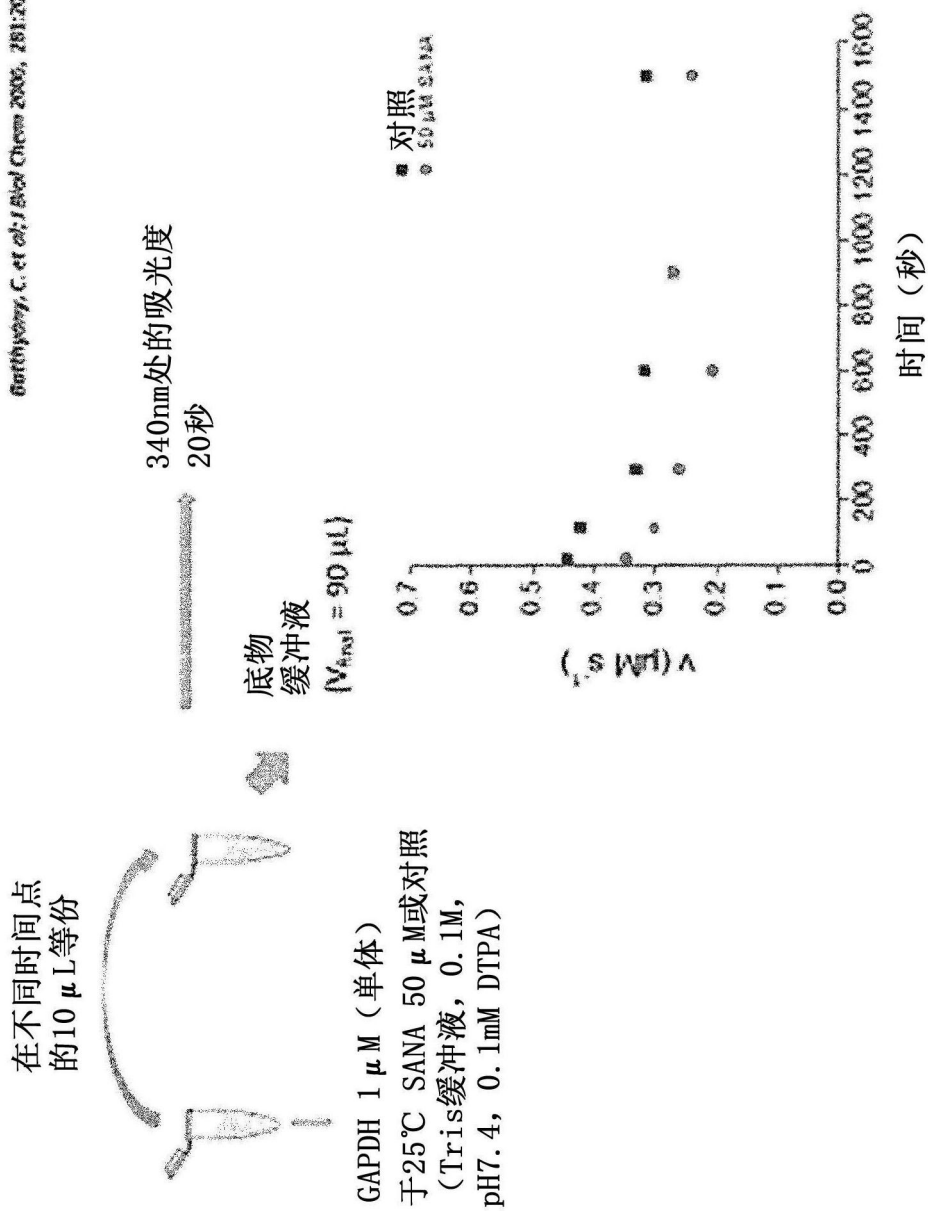


图15



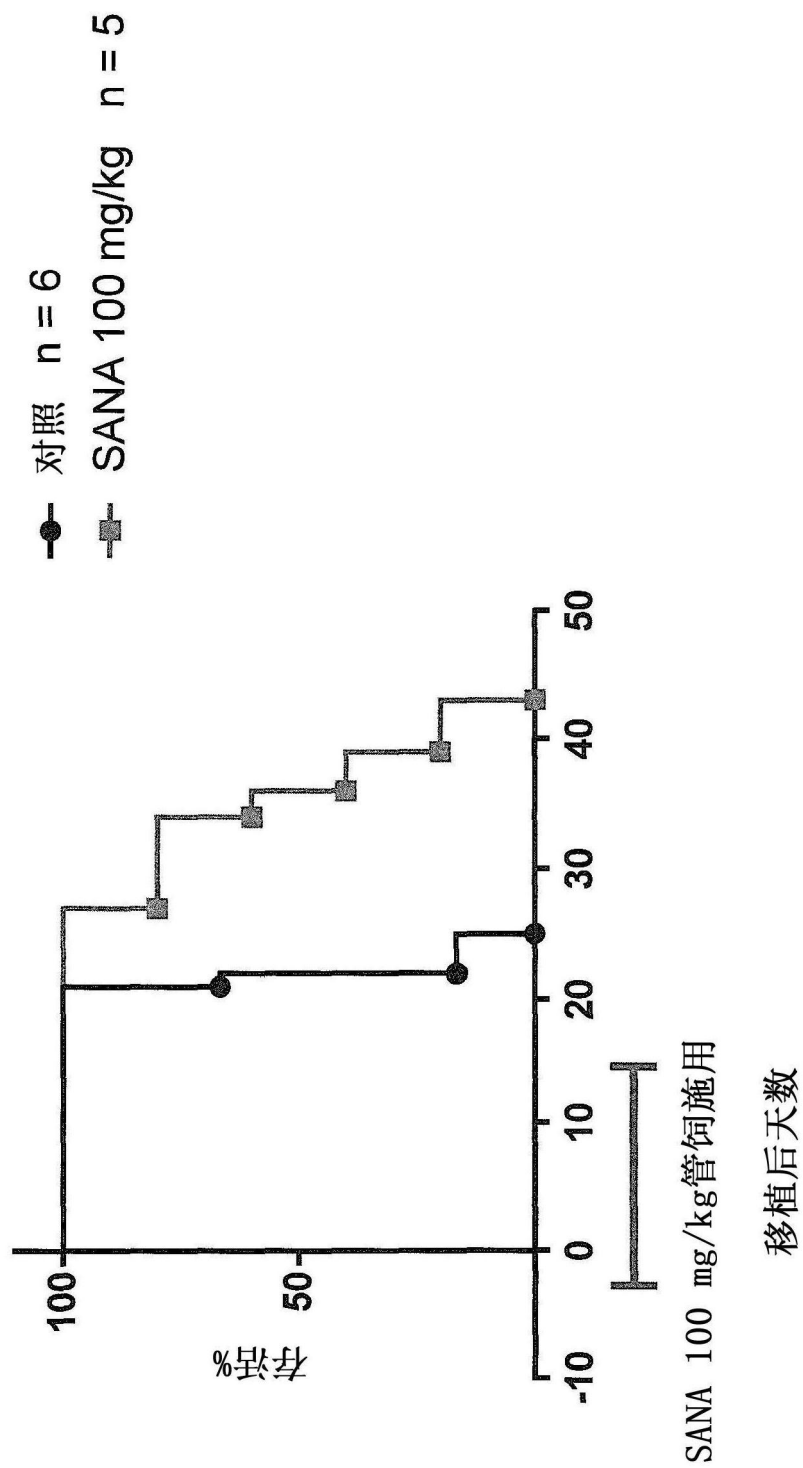


图16

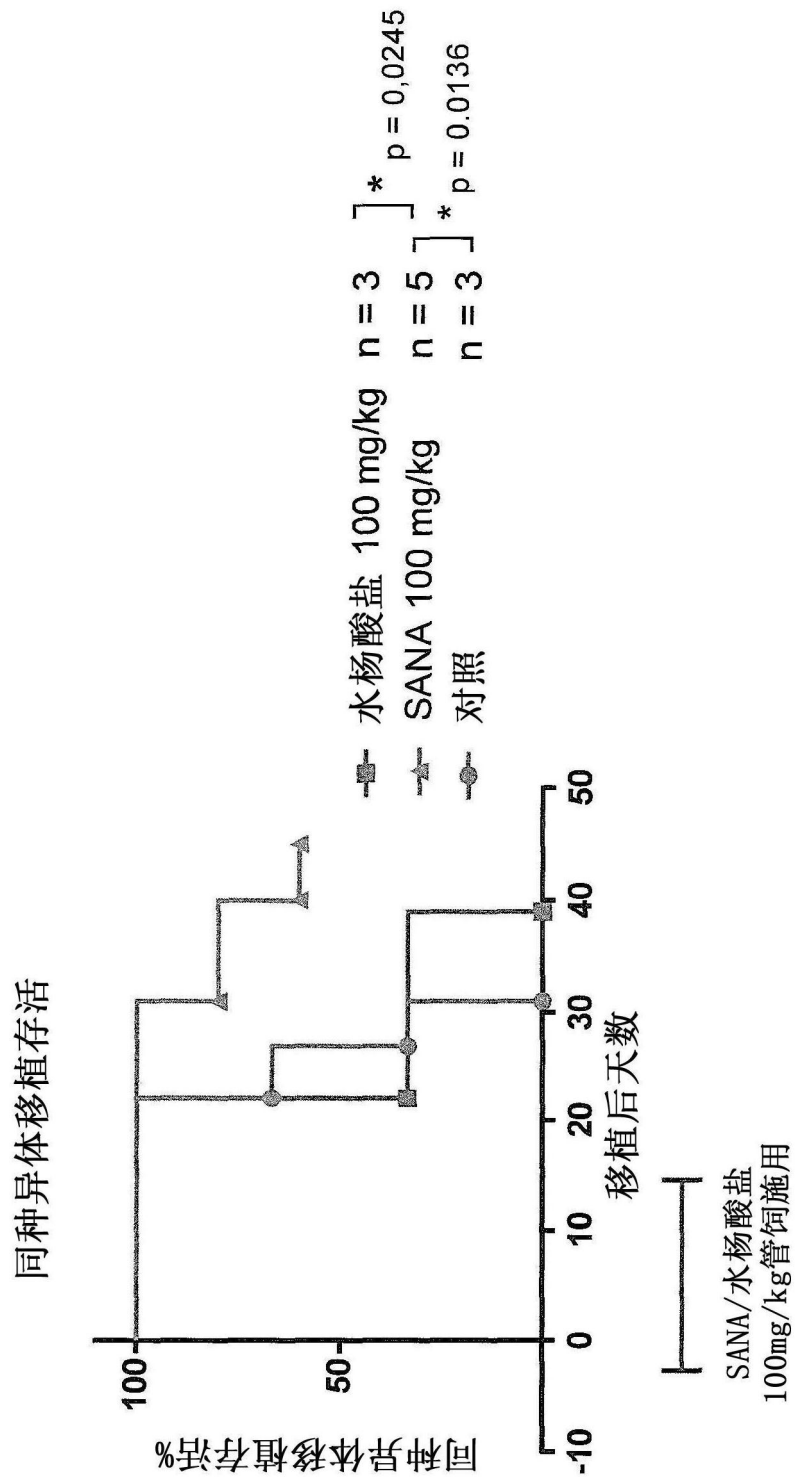


图17