



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106456576 A

(43)申请公布日 2017. 02. 22

(21)申请号 201580022302.1

(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291

(22)申请日 2015.05.06

代理人 黄志华 石磊

(30)优先权数据

61/990,606 2014.05.08 US

62/042,072 2014.08.26 US

14/490,618 2014.09.18 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/095(2006.01)

A61K 31/085(2006.01)

A61K 31/075(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/029457 2015.05.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/171755 EN 2015.11.12

(71)申请人 美迪诺亚公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 松田和子 岩城裕一

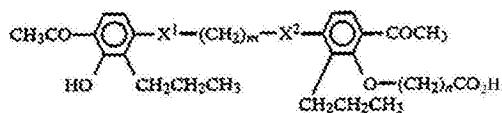
权利要求书3页 说明书20页 附图12页

(54)发明名称

治疗晚期非酒精性脂肪性肝炎的方法

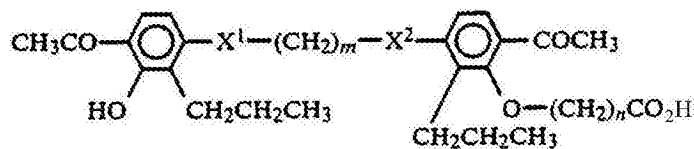
(57)摘要

式(I)化合物、或式(I)化合物的代谢物、或式(I)化合物的酯、或式(I)化合物的酯的代谢物、或其各自的药学上可接受的盐用于抑制或治疗晚期非酒精性脂肪性肝炎、导致它的疾患或者由它引起的疾患、和/或其各自的副作用,其中, m、n、X¹和X²如本文所定义。



(I)。

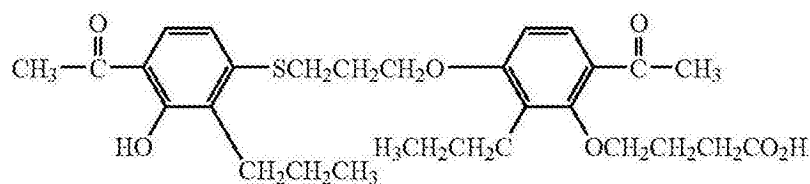
1. 一种治疗被诊断患有晚期非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的患者的方法, 所述方法包括向所述患者施用有效量的式 (I) 化合物、所述式 (I) 化合物的代谢物、所述式 (I) 化合物的酯、或所述式 (I) 化合物的酯的代谢物、或上述各自的药学上可接受的盐:



(I)

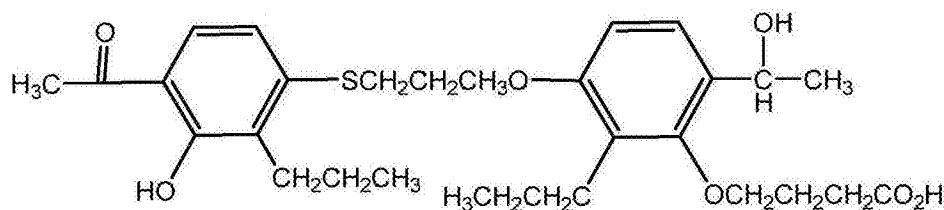
其中, m 是包括 2 和 5 的 2 至 5 的整数, 且 n 是包括 3 和 8 的 3 至 8 的整数, X^1 和 X^2 各自独立地表示硫、氧、亚硫酰基或磺酰基, 条件是 X^1 和 X^2 不同时为氧。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述式 (I) 化合物具有式 (IA):



(IA)。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述式 (I) 化合物的代谢物为式 (IB) 化合物:



(IB)。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述化合物经口施用。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 所述化合物作为片剂或胶囊剂施用。

6. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中, 所述化合物以斜方晶型存在。

7. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述化合物作为液体剂型施用。

8. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述化合物以大约 100mg/天至大约 4000mg/天的量分成一份、两份或三份施用。

9. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述被诊断患有晚期 NASH 的患者具有肝纤维化、蜘蛛血管瘤、腹水、脾肿大、肝边缘硬化、掌红斑、扑翼样震颤或门脉高压症中的一者或多者。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述患者的肝纤维化被减小。

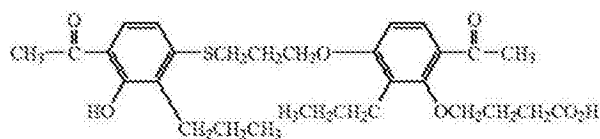
11. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述被诊断患有晚期 NASH 的患者具有肝结疤、肝硬化、或肝细胞癌 (HCC) 中的一者或多者。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 所述患者的肝结疤被减小。

13. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述患者为小儿患者。

14. 一种治疗被诊断患有晚期 NASH 的患者的方法, 所述方法包括向所述患者施用有效

量的式 (IA) 化合物、所述式 (IA) 化合物的代谢物、所述式 (IA) 化合物的酯、或所述式 (IA) 化合物的酯的代谢物、或上述各自的药学上可接受的盐：



(IA)。

15. 根据权利要求14所述的方法，其中，所述化合物经口施用。

16. 根据权利要求14所述的方法，其中，所述化合物作为片剂或胶囊剂施用。

17. 根据权利要求14所述的方法，其中，所述化合物作为液体剂型施用。

18. 根据权利要求13所述的方法，其中，所述化合物以大约100mg/天至大约4000mg/天的量分成一份、两份或三份施用。

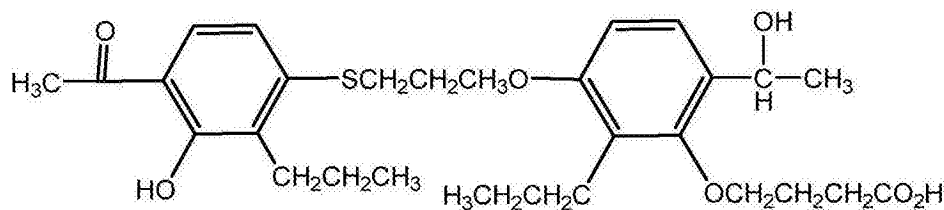
19. 根据权利要求14所述的方法，其中，所述被诊断患有晚期NASH的患者具有肝纤维化、蜘蛛血管瘤、腹水、脾肿大、肝边缘硬化、掌红斑、扑翼样震颤或门脉高压症中的一者或多者。

20. 根据权利要求19所述的方法，其中，所述患者的肝纤维化被减小。

21. 根据权利要求14所述的方法，其中，所述被诊断患有晚期NASH的患者具有肝结疤、肝硬化、或肝细胞癌 (HCC) 中的一者或多者。

22. 根据权利要求21所述的方法，其中，所述患者的肝结疤被减小。

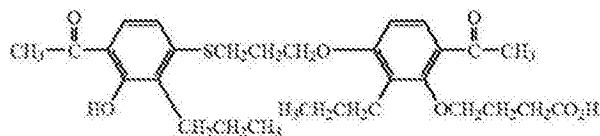
23. 一种治疗被诊断患有晚期NASH的患者的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的式 (IB) 化合物、所述式 (IB) 化合物的酯、或上述各自的药学上可接受的盐：



(IB)。

24. 根据权利要求23所述的方法，其中，所述化合物经口施用。

25. 一种治疗被诊断患有晚期NASH的患者的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的式 (IA) 化合物、所述式 (IA) 化合物的代谢物、所述式 (IA) 化合物的酯、或所述式 (IA) 化合物的酯的代谢物、或上述各自的药学上可接受的盐：



(IA)，

其中，上述各个物质以包括斜方晶体的固体剂型提供。

26. 根据权利要求25所述的方法，其中，所述化合物以大约100mg/天至大约4000mg/天的量分成一份、两份或三份施用。

27. 根据权利要求24所述的方法，其中，所述被诊断患有晚期NASH的患者具有肝纤维

化、蜘蛛血管瘤、腹水、脾肿大、肝边缘硬化、掌红斑、扑翼样震颤或门脉高压症中的一者或多者。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中, 所述患者的肝纤维化被减小。

29. 根据权利要求24所述的方法, 其中, 所述被诊断患有晚期NASH的患者具有肝结疤、肝硬化、或肝细胞癌 (HCC) 中的一者或多者。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中, 所述患者的肝结疤被减小。

治疗晚期非酒精性脂肪性肝炎的方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年5月8日提交的美国临时申请第61/990,606号、2014年8月26日提交的美国临时申请第62/042,072号和2014年9月18日提交的美国申请第14/490,618号的优先权,各个所述申请的内容通过引用整体并入本文。

技术领域

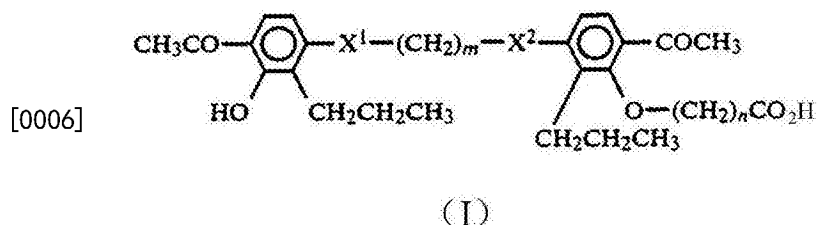
[0003] 本发明涉及通过施用苯氧基烷基羧酸(诸如MN-001和MN-002)抑制或治疗晚期非酒精性脂肪性肝炎、导致它的疾患或者由它引起的疾患、和/或其各自的副作用的方法。

背景技术

[0004] 非酒精性脂肪性肝炎或NASH是一种常见的肝病,其类似于酒精性肝病,但出现在饮用少许的酒精或不饮用酒精的人群中。NASH的主要特征是肝中的脂肪,伴随有炎症和损伤。NASH可发展成晚期NASH,该晚期NASH尤其以肝纤维化为特征。晚期NASH及导致晚期NASH的疾患或由晚期NASH引起的疾患是一种影响每个年龄段人的全球日益严重的问题。

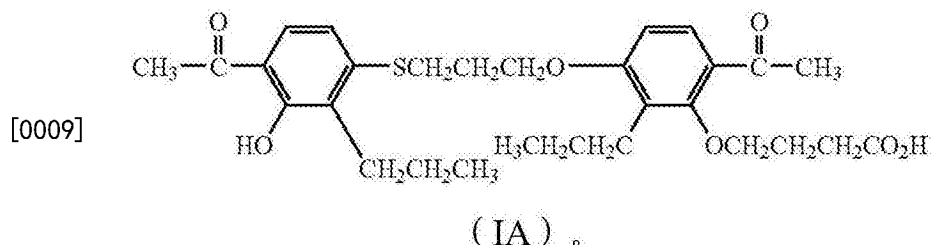
发明内容

[0005] 本申请提供一种治疗被诊断患有晚期非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的患者的方法,所述方法包括向患者施用有效量的式(I)化合物、式(I)化合物的代谢物、式(I)化合物的酯、或式(I)化合物的酯的代谢物、或上述各自的药学上可接受的盐:



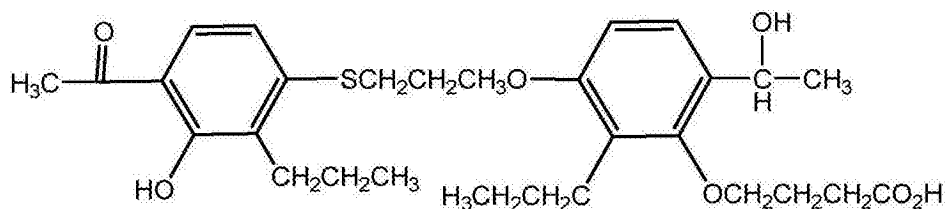
[0007] 其中,m是2至5的整数(包括2和5),且n是3至8的整数(包括3和8), X^1 和 X^2 各自独立地表示硫、氧、亚硫酰基($-\text{S}(\text{O})-$)或磺酰基($-\text{S}(\text{O})_2-$),条件是 X^1 和 X^2 不同时为氧。

[0008] 在一个特定的实施方式中,式(I)化合物具有式(IA):



[0010] 在另一个实施方式中,式(I)化合物的代谢物为式(IB)化合物:

[0011]



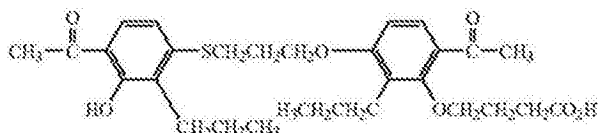
(IB)。

[0012] 优选地,所述化合物以诸如片剂或胶囊剂的固体剂型经口施用,且更优选地,所述化合物以斜方晶型存在。所述化合物也可以以液体剂型施用。所述化合物可以以分成一份、两份或三份的大约100mg/天至大约4000mg/天的量施用。

[0013] 在又一实施方式中,被诊断患有NASH的患者具有肝纤维化、蜘蛛血管瘤、腹水、脾肿大、肝边缘硬化(hard liver border)、掌红斑、扑翼样震颤或门脉高压症中的一者或多者。患者还会具有肝结疤、肝硬化、或肝细胞癌(HCC)中的一者或多者。在一些例子中,患者的肝纤维化减小。在其他的例子中,患者的肝结疤减小。所述患者还可以是小儿患者、青少年患者、或成人患者。

[0014] 本申请还提供一种治疗被诊断患有晚期NASH的患者的方法,所述方法包括向患者施用有效量的式(IA)化合物、式(IA)化合物的代谢物、式(IA)化合物的酯、或式(IA)化合物的酯的代谢物、或上述各自的药学上可接受的盐:

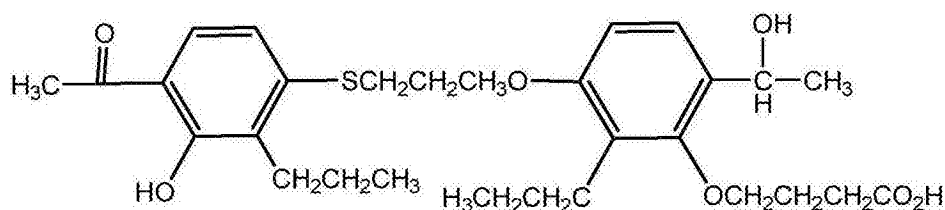
[0015]



(IA)。

[0016] 所提供的又一方法为治疗被诊断患有晚期NASH的患者的方法,所述方法包括向患者施用有效量的式(IB)化合物、式(IB)化合物的酯、或上述各自的药学上可接受的盐:

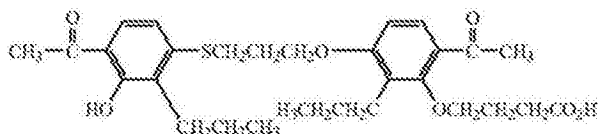
[0017]



(IB)。

[0018] 所提供的又一方法为治疗被诊断患有晚期NASH的患者的方法,所述方法包括向患者施用有效量的式(IA)化合物、式(IA)化合物的代谢物、式(IA)化合物的酯、或式(IA)化合物的酯的代谢物、或上述各自的药学上可接受的盐:

[0019]



(IA),

[0020] 其中,上述各个物质以包括斜方晶体的固体剂型提供。

[0021] 在另一方面,本方法可以降低患有晚期NASH的患者、尤其具有肝结疤的患者的肝

硬化或肝细胞癌 (HCC) 的可能性。

附图说明

- [0022] 图1A和图1B示出治疗和未治疗的小鼠的HE染色的肝切片的显微照片。
- [0023] 图2图形化地示出在治疗和未治疗的小鼠中的NAFLD活性评分 (NAS)。
- [0024] 图3图形化地示出在治疗和未治疗的小鼠中的脂肪变性评分。
- [0025] 图4图形化地示出在治疗和未治疗的小鼠中的小叶炎症评分。
- [0026] 图5图形化地示出在治疗和未治疗的小鼠中的肝细胞鼓胀评分。
- [0027] 图6A和图6B示出治疗和未治疗的小鼠的天狼星红染色的肝切片的显微照片。
- [0028] 图7图形化地示出在治疗和未治疗的小鼠中的纤维化面积的百分比。
- [0029] 图8图形化地示出在治疗和未治疗的小鼠中的炎症面积。
- [0030] 图9A和图9B示出治疗和未治疗的小鼠的 α -SMA免疫染色的肝切片的显微照片。

具体实施方式

[0031] 在下文中描述各个实施方式。应当注意,特定实施方式不用来作为详尽描述或作为对本文所讨论的更宽的方面的限制。结合特定实施方式所描述的一个方面不一定局限于该实施方式,且可以利用任何其他实施方式来实行。

[0032] 定义

[0033] 如本文和随附权利要求中所用,除非上下文另有清楚地指出,否则单数形式“一”(a、an)和“所述”包括复数的指代物。

[0034] 将药物“施用 (Administering)”或“施用 (Administration)”于患者 (以及该短语的语法等同物) 包括直接施用 (包括自行施用) 以及间接施用 (包括开处方药物的行为)。例如,如本文所用,指导患者自行施用药物和/或为患者提供药物处方的医师正在将药物施用于患者。

[0035] “晚期NASH”指导致一种或多种症状 (诸如蜘蛛血管瘤、腹水、脾肿大、肝边缘硬化、掌红斑、扑翼样震颤、肝纤维化和肝细胞癌) 的NASH的进展。晚期NASH也与诸如肝硬化和肝功能衰竭的症状和肝移植相关联。

[0036] “C_x”当置于基团之前时指在该基团中的碳原子数目为X。

[0037] “烷基”是指具有1个至12个碳原子的一价非环状烃基。烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0038] “芳基”是指具有多达10个碳原子的一价芳族烃基。芳基的非限制性实例包括苯基和萘基。

[0039] “杂芳基”是指在芳族环内具有1个至10个碳原子以及1个至4个选自氧、氮、硫的杂原子的芳族基团,其中杂芳基的氮原子和/或硫原子可选地被氧化 (例如, N-氧化物、-S(O)-或-S(O)₂-)。此类杂芳基可具有单环 (例如,吡啶基或呋喃基) 或多个稠环 (例如,吲哚基或苯并噻吩基), 其中稠环可以是或可以不是芳族的和/或可以含有或可以不含有杂原子, 条件是连接点通过芳族杂芳基的原子。杂芳基的非限制性实例包括吡啶基、吡咯基、呋喃基、噻吩基和咪唑基。

[0040] “环烷基”是指具有3个至12个碳原子的一价非芳族环状烃基。环烷基的非限制性

实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

[0041] “杂环基”是指在环内具有1个至10个碳原子以及1个至4个选自氧、氮、硫的杂原子的一价非芳族环状基团,其中杂芳基的氮原子和/或硫原子可选地被氧化(例如,N-氧化物、 $-S(0)-$ 或 $-S(0)_2-$)。此类杂芳基可具有单环(例如,哌啶基或四氢呋喃基)或多个稠环,其中稠环可以是或可以不是芳族的和/或可以含有或可以不含有杂原子,条件是连接点通过非芳族杂环基的原子。杂环基的非限制性实例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基等。

[0042] “氨基”是指 $-NH_2$ 。

[0043] “烷基氨基”是指 $-NHR_B$,其中 R_B 是任选地用1个至3个芳基、杂芳基、环烷基或杂环基基团取代的 C_1-C_6 烷基。

[0044] “二烷基氨基”是指 $-N(R_B)_2$,其中 R_B 如上所定义。

[0045] “包括/包含”应意指方法和组合物包括列举的要素,但不排除其它要素。“基本上由……组成”,当用于定义方法和组合物时,应意指为了陈述的目的,排除对组合具有任何重要意义的其它要素。因此,基本上由本文所定义的要素组成的组合物将不排除来自分离和纯化方法的微量污染物及药学上可接受的载体、诸如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等。“由……组成”应意指排除多于微量的其它成分要素及用于施用本发明的组合物的实质性方法步骤或者产生组合物或获得预期结果的方法步骤。由这些过渡术语和短语中的每一者定义的实施方式在本发明的范围内。

[0046] 本文所用的化合物的“有效量”是当向如本文所治疗的患者施用时将具有预期疗效(如患者的医学病况的一种或多种表现的减轻、改善、缓解或消除)的量。完全疗效不一定通过施用一剂(或剂量)发生,并且可仅在施用连续剂量后发生。因此,有效量可以以一次或多次施用被施用。

[0047] “非酒精性脂肪性肝炎”或NASH是一种常见的肝病,其类似于酒精性肝病,但出现在饮用少许酒精或不饮用酒精的人群中。NASH的主要特征是肝中的脂肪,连同炎症和损伤。NASH可导致肝硬化,其中肝脏受损且结疤且不再能够正常工作。NASH影响了2%至5%的美国人口。当前,对NASH不存在特异性的疗法。另有10%至20%的美国人在其肝脏中具有脂肪,但没有明显的炎症或肝损伤,一种被称为“非酒精性脂肪性肝病”(NAFLD)的疾患。尽管在肝中具有脂肪不常见,但其本身可能几乎不引起伤害或永久性损伤。如果基于血液测试结果或肝扫描疑似具有脂肪,则该问题被称为NAFLD。如果肝活检在这种情况下进行,则其将显示一些人具有NASH而其他人具有NAFLD。

[0048] NASH通常首先疑似存在于在包含在常规血液测试板内的肝测试(诸如丙氨酸氨基转移酶(ALT)或天冬氨酸氨基转移酶(AST))中发现具有升高的人中。当进一步评估显示没有显著的肝病原因(诸如药物、病毒性肝炎或过度使用酒精)时且当肝的x射线或成像研究显示脂肪时,疑似NASH。通过肝活检NASH被诊断且与NAFLD分开。对于肝活检,将针插入经过皮肤以去除一小片肝。当用显微镜检查组织显示脂肪连同炎症和对肝细胞的损伤时,诊断出NASH。活检可以提供关于疤痕组织已在肝中形成的信息。

[0049] NASH可以但不总是缓慢恶化,发展成晚期NASH,引起结疤或纤维化出现和累积在肝中。因为纤维化恶化,会形成肝硬化,且肝变得严重结疤、硬化且不能正常起作用。一旦严重的结疤或肝硬化存在,几乎没有治疗可终止进展。具有肝硬化的人会经历体液潴留、肌肉萎缩、肠道出血和肝衰竭。肝移植是肝衰竭晚期肝硬化的唯一治疗,且移植在具有晚期NASH

的人中越来越多地进行。例如,NASH在美国是连同丙型肝炎和酒精性肝病一起被列为肝硬化主要原因之一。

[0050] 总的来说,与普通人群相比,NASH患者的发病率和死亡率已显示明显更高。冠状动脉疾病和紧接着肝相关死亡的恶性肿瘤是NASH患者中最常见的死亡原因。与普通人群中的人们相比,具有NASH的儿童也具有明显更短的存活时间。

[0051] 15%至25%的具有晚期NASH的患者在10年至20年期间发展成肝硬化及其并发症。在最初活检时,多达三分之一的NASH患者具有晚期肝纤维化,而10%至15%的NASH患者具有得到确认的肝硬化。目前公认的是,具有隐源性肝硬化的大部分患者具有耗竭性(burned-out) NASH:脂肪变性或脂肪性肝炎的组织学特征被慢性肝硬化(bland cirrhosis)所替代。

[0052] 当出现肝硬化时,会呈现出慢性肝病的特征(诸如蜘蛛血管瘤、腹水、脾肿大、肝边缘硬化、掌红斑或扑翼样震颤)。患者会对黄疸或瘙痒抱怨,或者他们会呈现有门脉高压症的并发症(例如,腹水、静脉曲张出血或脑病)。

[0053] 晚期NASH中的肝硬化是肝细胞癌(HCC)发展的危险因素。在20年期间,已报道NASH患者中HCC的患病率高达2.8%。日本患者的数据报道HCC的累积率在5年会是高达15%。与晚期NASH相关的肝硬化是肝移植的逐渐增加的指征。

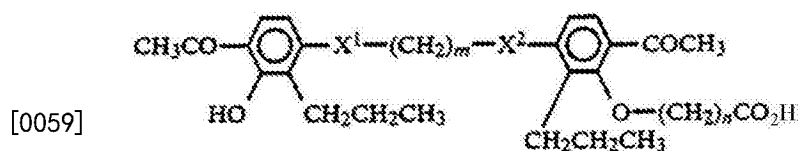
[0054] “药学上可接受的”是指无毒且适于施用给患者、包括人患者。

[0055] “药学上可接受的盐”是指无毒且适于施用给患者的盐。非限制性实例包括碱金属盐、碱土金属盐和各种伯铵盐、仲铵盐和叔铵盐。当式(I)化合物的酯包括阳离子部分时,例如当所述酯包括氨基酸酯时,其盐可包括各种羧酸盐、磺酸盐和矿物酸盐(mineral acid salt)。盐的某些非限制性实例包括钠盐、钾盐和钙盐。

[0056] “保护基团”是指众所周知的官能团,当结合至官能团时其使得所得的受保护的官能团对于待在化合物的其它部分上进行的反应以及相应的反应条件是惰性的,且该官能团可在去保护条件下反应再生原始官能度。保护基团被选择成与分子的剩余部分相容。“羧酸保护基团”在苯氧基烷基羧酸的合成期间保护苯氧基烷基羧酸的羧酸官能度。羧酸保护基团的非限制性实例包括苄基、对甲氧基苄基、对硝基苄基、烯丙基、二苯甲基和三苯甲基。羧酸保护基团的另外实例见于标准参考著作中,诸如Greene和Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,第2版,1991,John Wiley&Sons和McOmie Protective Groups in Organic Chemistry,1975,Plenum Press。用于保护和去保护本文公开的羧酸的方法可见于本领域中,且特别见于Greene和Wuts,同上及其引用的文献。

[0057] “治疗”医学疾患或患者是指采取步骤以获得有益的或所需的结果,包括临床结果。为了本发明的各方面和实施方式的,有益的或所需的临床结果包括但不限于减少、减轻或改善晚期NASH的一种或多种表现或副作用,改善一种或多种临床结果,减小晚期NASH的程度,延缓或减缓晚期NASH的进展,改善、缓解或稳定纤维化状态,及本文所述的其它有益结果。

[0058] 本申请提供施用有效量的式(I)化合物或其代谢物、或式(I)化合物的酯或其代谢物、或上述各自的药学上可接受的盐,其中,变量如本文所定义:



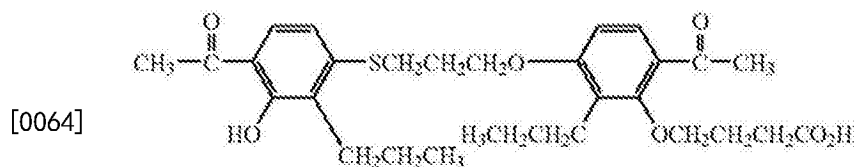
(I)。

[0060] 如本文所用,“其代谢物”是指显示与式(I)化合物基本上类似的治疗活性的代谢物。此类代谢物的非限制性实例包括化合物,其中式(I)化合物的附接至含有 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ 部分的苯基的 $-\text{COCH}_3$ 基团被代谢为1-羟乙基 $(-\text{CH}(\text{OH})\text{Me})$ 基团。

[0061] 含有此类1-羟乙基基团的代谢物在1-羟乙基基团的1-位上含有不对称中心。相应的对映异构体及其混合物(包括外消旋混合物)包括在如本文使用的式(I)化合物的代谢物的范围内。

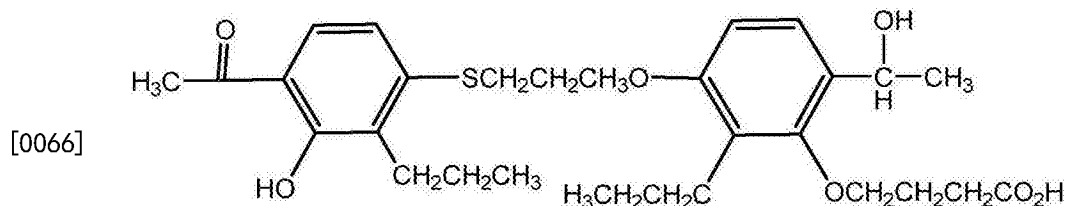
[0062] 如本文所用,“其酯”是指酚羟基基团的酯和/或式(I)化合物中显示的羧酸的酯,及式(I)化合物的代谢物的1-羟乙基(脂肪族羟基基团)基团的酯。酚羟基基团和/或脂肪族羟基基团的酯可包括但不限于作为相应的酸的羧酸 $\text{R}_A-\text{CO}_2\text{H}$,其中 R_A 是 C_1-C_6 烷基、芳基、杂芳基、 C_3-C_{12} 环烷基或 C_2-C_8 杂环基,其中烷基、芳基、杂芳基、环烷基或杂环基任选地被1个至4个 C_1-C_3 烷基、芳基、 CO_2H 、氨基、烷基氨基或二烷基氨基基团取代。也考虑了其它酸,诸如单磷酸、二磷酸或三磷酸。羧酸酯可包括但不限于作为相应的醇的式 R_A-OH 化合物,其中 R_A 如上所定义。在一个实施方式中,仅式(I)中的羧酸被酯化。在另一个实施方式中,仅式(I)中的酚羟基基团被酯化。在另一个实施方式中, R_A 是 C_1-C_4 烷基。如对于本领域技术人员将显而易见的是,此类酯用作前药,其在体内被水解以释放式(I)化合物或其盐。

[0063] 在一个实施方式中,式(I)化合物是式(IA)化合物:



(IA)。

[0065] 在另一个实施方式中,式(I)和式(IA)化合物的代谢物是式(IB)化合物:



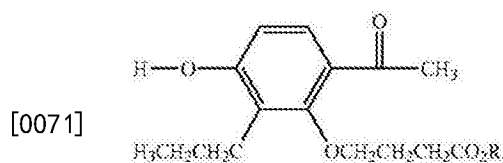
(IB)。

[0067] 在另一个实施方式中,所述化合物经口施用。在另一个实施方式中,所述化合物作为片剂或胶囊剂施用。在另一个实施方式中,式(IA)化合物以基本上不含其它多晶型的多晶型A存在。在另一个实施方式中,所述化合物作为液体剂型施用。在另一个实施方式中,所述化合物以分成一份、两份或三份的大约100mg/天至大约4000mg/天的量施用。

[0068] 本文所用的化合物的功效可通过技术人员众所周知的方法(如在晚期NASH和相关的肝疾患的链脲菌素诱导的模型中的方法)来测试。

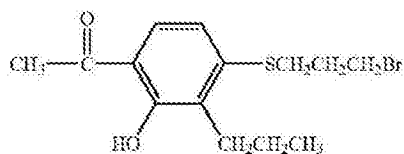
[0069] 合成

[0070] 式(I)化合物的合成和某些生物活性描述于美国专利No.4,985,585中,其通过引用整体并入本文。例如,式(IA)化合物通过使式(II)的苯酚与式(III)化合物反应以提供式(IC)化合物来制备:



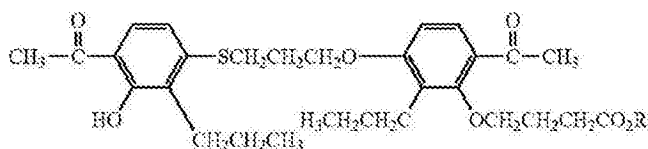
(II)

[0072] 其中,R是羧酸保护基团,



(III)

[0073]



(IC)。

[0074] 酸性保护基团或R基团的非限制性实例包括C₁-C₆烷基、苄基、二苯甲基和三苯甲基,其中苄基、二苯甲基或三苯甲基基团任选地被1个至6个C₁-C₆烷基、卤素基团和/或C₁-C₆烷氧基基团取代。对于本领域技术人员显而易见的是可使用不同于式(III)中的溴基团的离去基团。此类其它离去基团的非限制性实例包括氯或甲苯磺酸根。

[0075] 式(IC)的受保护的羧酸的脱保护提供了式(IA)化合物。基于本申请显而易见的是,式(IC)化合物在根据本发明的一些实施方式中是有用的。脱保护方法的非限制性实例包括碱性水解和在H₂以及诸如Pd/C或Pt/C的催化剂下的氢解。

[0076] 反应在惰性有机溶剂中进行,该惰性有机溶剂例如且不限于丙酮、甲基乙基酮、二乙基酮或二甲基甲酰胺。亲核取代反应可在低于室温的温度(高达溶剂回流温度)下在无机基质(诸如碳酸钾或碳酸钠)的存在下和任选地在碘化钾的存在下进行。反应进行一段足以提供如通过众所周知的方法(诸如薄层色谱法和¹H-NMR)确定的大量产物的时间段。本文利用的其它化合物通过遵循本文所描述的步骤以及起始材料的适当取代和/或遵循技术人员熟知的方法制得。还参见美国专利No.5,290,812(通过引用以其整体并入本文)。

[0077] 将式(IA)化合物在控制的条件下重结晶以提供基本上纯的斜方晶系多晶型物,被称为A型晶体(如90%或更多、优选至少95%的A型)。多晶型A和用于产生其的方法描述于美国专利No.7,060,854和No.7,064,146中;其通过引用整体并入本文。式(I)化合物的所有多晶型是活性的,但多晶型A是优选的。在某些条件下,该多晶型物的溶解度和生物利用率优于其它多晶型物,并因此A型可提供改善的固体制剂或固体剂型。

[0078] A型晶体可例如通过在25℃至40℃下将式(IA)化合物溶解于5重量份至10重量份

的乙醇中以得到黄色至橘色溶液而获得。向乙醇溶液装入1份至10份水,并在20℃至25℃下搅动约15分钟至60分钟,然后在5℃至10℃下再搅动1小时至4小时、优选2.0小时至3.0小时的时间段,从而产生灰白色混悬液。向该混悬液添加5份至15份水,并将混合物在5℃至10℃下再搅动1小时至4小时、优选1.5小时至2.0小时。将固态的白色至灰白色的产物通过真空过滤分离,将滤饼用水洗涤并在25℃至40℃下真空干燥12小时至24小时。

[0079] 对于本文利用的以对映体形式存在的化合物,如式(I)化合物的某些代谢物(例如,式IB化合物),两种对映体可在光学上进行拆分。此类拆分通过例如但不限于与相应的羧酸化合物形成碱(如(S)-(-)-1-(1-萘基)乙胺)的非对映盐,或通过使用手性柱色谱法分离对映体来进行。此类化合物的中间体也可以进行类似地拆分,所述中间体也以对映体形式存在。

[0080] 施用和配制

[0081] 本文所用的化合物可经口或通过静脉内、肌内和皮下注射或透皮方法施用。有效剂量水平可广泛变化,如约100mg/天至约4000mg/天。在一个实施方式中,每日剂量范围是250mg至2000mg,以一份、两份或三份给予。在一个实施方式中,每日剂量范围是100mg至500mg,如100mg、200mg、300mg、400mg或500mg,以一份、两份或三份给予。在一个实施方式中,每日剂量范围是250mg至2000mg,如250mg、500mg、750mg、1000mg、1250mg、1500mg、1750mg或2000mg,以一份、两份或三份给予。在一个实施方式中,每日剂量范围是1000mg至4000mg,如1000mg、2000mg、3000mg或4000mg,以一份、两份或三份给予。在另一个实施方式中,所述剂量是1000mg,每天两次。在另外的实施方式中,适合的剂量包括1000mg qd(每天一次)、1000mg bid(每天两次)和750mg tid(每天三次)。

[0082] 实际量将取决于正在治疗的患者的情况。如本领域技术人员公认的,改变活性物质作用的许多因素将被治疗医师考虑在内,如患者的年龄、体重、性别、饮食和病况、施用时间、施用速率和途径。对于给定疾患组的最佳剂量可以由本领域技术人员使用常规的剂量测定试验来确定。

[0083] 本文利用的化合物可以以任何药学上可接受的形式进行配制,包括液体、粉剂、乳膏剂、乳剂、丸剂、锭剂、栓剂、混悬剂、溶液等。含有本文利用的化合物的治疗组合物将通常根据已知的且确定的实践与一种或多种药学上可接受的成分一起配制。通常,利用例如约10重量%的单独的或与羧甲基纤维素(Avicel)组合的载体(如改性淀粉)形成片剂。在片剂形成过程中,在1000磅至3000磅压力下压缩制剂。片剂优选显示出约1.5kp/cm²至8.0kp/cm²的平均硬度,优选为5.0kp/cm²至7.5kp/cm²。崩解时间从约30秒变化至约15分钟或20分钟。

[0084] 用于口服使用的制剂可以被提供为硬胶囊,其中本文利用的治疗活性化合物与诸如碳酸钙、磷酸钙或高岭土的惰性固体稀释剂混合;或者被提供为软胶胶囊,其中化合物与油性介质,例如液状石蜡或橄榄油混合。合适的载体包括碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。

[0085] 本文利用的化合物可被配制为与药学上可接受的赋形剂混合的水性混悬剂,所述药学上可接受的赋形剂如悬浮剂,例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂,如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、或者碱性氧化物与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)、或者环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七乙烯氧基鲸蜡醇(heptadecaethylene-oxycetanol))、

或者环氧乙烷与源于脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)、或者环氧乙烷与源于脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)。此类水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂(例如乙基-或正丙基-对羟基苯甲酸酯)、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂(如甘油、山梨糖醇、蔗糖、糖精或环己基氨基磺酸钠或环己基氨基磺酸钙)。

[0086] 适合的制剂还包括缓释剂型,诸如美国专利No.4,788,055;No.4,816,264;No.4,828,836;No.4,834,965;No.4,834,985;No.4,996,047;No.5,071,646;和No.5,133,974中描述的那些,其内容通过引用整体并入本文。

[0087] 适合于口服施用的其它形式包括液体形式制剂(包括乳剂、糖浆剂、酏剂、水溶液)、或者固体形式制剂(其用来在使用前即刻转化成液体形式制剂)。乳剂可以在溶液中(例如,在丙二醇水溶液中)制备,或者可以含有乳化剂,例如卵磷脂、山梨聚糖单油酸酯或阿拉伯胶。水溶液可以通过将活性组分溶解于水并添加合适的着色剂、调味剂、稳定剂和增稠剂来制备。固体形式制剂可以含有除活性组分之外的着色剂、调味剂、稳定剂、缓冲剂、人工甜味剂和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、溶解剂等。

[0088] 本文利用的化合物可配制用于肠胃外施用(例如通过注射,例如快速注射或连续输注)并且可以以单位剂量形式存在于添加了防腐剂的安瓿、预装注射器、小体积输注或多剂量容器中。组合物可以采用诸如在油性媒介物或水媒介物中的混悬剂、溶液或乳剂的形式,例如聚乙二醇水溶液的形式。油性或非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如,橄榄油)和可注射的有机酯(例如,油酸乙酯),并且可以含有诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂或悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的配制剂。可替代地,活性成分可以为通过无菌固体的无菌分离或通过溶液的冷冻干燥获得的粉末形式,用于在使用前用合适的媒介物(例如无菌、无热原的水)复溶(constitution)。

[0089] 本文所用的化合物可配制用于经鼻施用。将溶液或混悬剂通过常见方法例如用滴管、移液管或喷雾直接施加至鼻腔。所述制剂可以单剂量或多剂量形式提供。患者可经由滴管或移液管施用适当的预定体积的溶液或混悬剂。喷雾可例如通过计量雾化喷雾泵的方式施用。

[0090] 本文利用的化合物可配制用于气溶胶施用,特别是至呼吸道并且包括鼻内施用。化合物将通常具有例如大约5微米或更小的小粒径。此类粒径可以通过本领域已知的方法,例如通过微粉化获得。用合适的推进剂如氟氯化碳(CFC)(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷或二氯四氟乙烷)、二氧化碳或其它合适的气体在加压包中提供活性成分。气溶胶还可以适当地含有诸如卵磷脂的表面活性剂。药物的剂量可以通过计量阀门控制。可替代地,活性成分可以以干粉的形式提供,例如在合适的粉末基质如乳糖、淀粉、淀粉衍生物(如羟丙基甲基纤维素)和聚乙烯吡咯烷中的化合物的粉末混合物。粉末载体将在鼻腔中形成凝胶。粉末组合物可以以单位剂量形式存在于例如明胶或泡罩包装的胶囊或药筒中,所述粉末可从所述明胶或泡罩包装的胶囊或药筒通过吸入器的方式施用。

[0091] 本文利用的化合物可配制用于以软膏剂、乳膏剂或洗剂、或者以透皮贴剂局部施用于表皮。软膏剂和乳膏剂可以例如用添加合适的增稠剂和/或胶凝剂的水性基质或油性基质来配制。洗剂可以用水性基质或油性基质配制并且将通常还含有一种或多种乳化剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂或着色剂。适合于在口中局部施用的制剂包括在调味基质

(通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中包含活性剂的锭剂;在诸如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶的惰性基质中包含活性成分的糖果锭剂;以及在合适的液体载体中包含活性成分的漱口水。

[0092] 本文利用的化合物可配制成栓剂用于施用。在此类制剂中,低熔点蜡,如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物首先熔化,活性组分例如通过搅拌均匀分散。然后,将熔化的均匀混合物倒入合适尺寸的模具中,以使冷却和固化。

[0093] 本文利用的化合物可配制用于阴道施用。除了活性成分之外含有此类载体的阴道栓、棉塞、乳膏剂、凝胶、糊剂、泡沫剂或喷雾剂是本领域已知适当的。

[0094] 当需要时,制剂可以制备有适合于活性成分的缓释或控释施用的肠溶包衣。可以用于本发明目的的常见类型的控释制剂包括惰性芯(如糖球)、第一层(其包被有含有内层药物的第二层)以及控制内层药物释放的外膜或第三层。

[0095] 芯部优选是水溶性或可膨胀的材料,并且可以为常规地用作芯的任何此类材料或制成珠或球的任何其它药学上可接受的水溶性或水可膨胀的材料。芯可以为材料(如蔗糖/淀粉(糖球NF)、蔗糖晶体)的球体或通常包括诸如微晶纤维素和乳糖的赋形剂的挤出的且干燥的球体。

[0096] 第一层中基本上水不溶性材料通常是“GI不溶性”或“GI部分不溶性”成膜聚合物(分散或溶解于溶剂中)。作为例子可提及乙基纤维素、醋酸纤维素、醋酸丁酸纤维素、聚甲基丙烯酸酯(诸如丙烯酸乙酯/甲基丙烯酸甲酯共聚物(Eudragit NE-30-D)和甲基丙烯酸铵酯共聚物A型和B型(Eudragit RL30D和RS30D))、及硅酮弹性体。通常,增塑剂与所述聚合物一起使用。示例性增塑剂包括:癸二酸二丁酯、丙二醇、柠檬酸三乙酯、柠檬酸三丁酯、蓖麻油、乙酰化单甘酯、乙酰基柠檬酸三乙酯、乙酰基柠檬酸丁酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、三醋精、分馏椰子油(中链甘油三酯)。

[0097] 含有活性成分的第二层可以包括含有或不含作为粘合剂的聚合物的活性成分(药物)。当使用时,粘合剂通常为亲水的,但是可以为水溶性的或水不溶性的。在含有活性药物的第二层中使用的示例性聚合物为亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮,聚烷撑二醇(如聚乙二醇),明胶,聚乙烯醇,淀粉及其衍生物,纤维素衍生物(如羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羧乙基纤维素、羧甲基羟乙基纤维素),丙烯酸聚合物,聚甲基丙烯酸酯或任何其它药学上可接受的聚合物。在第二层中药物与亲水聚合物的比率通常在1:100至100:1(w/w)的范围内。

[0098] 适用于第三层或膜中用于控制药物释放的聚合物可选自任选地与增塑剂(诸如上文提及的那些)组合的水不溶性聚合物或具有pH-依赖性溶解度的聚合物,诸如,例如乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、醋酸纤维素邻苯二甲酸酯、醋酸纤维素偏苯三酸酯、聚甲基丙烯酸酯或其混合物。

[0099] 可选地,控释层包括除上述聚合物之外的具有不同溶解度特性的另外的物质以调节渗透性,从而调节控释层的释放速率。可以与例如乙基纤维素一起用作改性剂的示例性聚合物包括:HPMC、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇、具有pH-依赖性溶解度的聚合物(如醋酸纤维素邻苯二甲酸酯或甲基丙烯酸铵酯共聚物和甲基丙烯酸共聚物)、或它们的混合物。如果需要的话,添加剂,如蔗糖、乳糖和药物级表面活性剂也可以包括在控释层中。

[0100] 本文还提供了制剂的单位剂型。在此类形式中,所述制剂被细分为含有适当量的活性组分(例如且不限于式(I)化合物或其酯、或者其各自的盐)的单位剂量。所述单位剂型可为包装制剂,所述包装含有离散量的制剂,诸如于小瓶或安瓿中的包装的片剂、胶囊剂和粉剂。此外,单位剂型可为胶囊剂、片剂、扁囊剂或锭剂本身,或者其可为呈包装形式的适当数量的任何胶囊剂、片剂、扁囊剂或锭剂。

[0101] 其它适合的药物载体及其制剂描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy 1995,E.W.Martin编著,Mack Publishing Company,第19版,Easton,Pa中。

[0102] 参考下面的实施例,将更加容易地理解由此一般地描述的本发明,该实施例作为说明提供且不用于本发明的限定。

[0103] 实施例

[0104] 下面的缩写被用在实施例中以及本申请的其他地方。

[0105] CCR:趋化因子受体

[0106] HE:苏木精和曙红

[0107] HFD:高脂膳食

[0108] MCP:单核细胞趋化蛋白

[0109] MMLV-RT:莫洛尼(Molony)小鼠白血病病毒逆转录酶

[0110] NAFLD:非酒精性脂肪性肝病

[0111] NAS:NAFLD活性评分

[0112] NASH:非酒精性脂肪性肝炎

[0113] SD:标准偏差

[0114] SMA:平滑肌肌动蛋白

[0115] SPF:无特定病原的

[0116] STAM:Stelic动物模型

[0117] STZ:链脲霉素

[0118] TIMP:金属蛋白酶的组织抑制剂

[0119] FLAP:5-脂氧合酶激活蛋白

[0120] LTC4:白三烯C4

[0121] 实施例1:晚期NASH的治疗

[0122] 将从SLC-Japan, Inc获得无病原体的怀孕15天的C57BL/6小鼠。在出生后且用高脂膳食(HFD;CLEA-Japan,日本)自由饲喂4周龄(28 ± 2 天)后,通过单次皮下注射STZ(Sigma,美国),将在雄性小鼠中形成NASH。在8周龄(63 ± 2 天)时(在治疗开始前一天),将小鼠随机分成6组,每组10只。在治疗期间,将每日测量个体重量,将每日监控小鼠的存活力、临床体征和行为。

[0123] 将利用下面的研究组。

[0124] 组1(正常):向十只正常小鼠自由饲喂正常膳食而不经任何治疗直至12周龄。

[0125] 组2(媒介物):向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以10mL/kg的量每日一次经口施用媒介物[0.3%CMC]。

[0126] 组3(MN-001-低剂量):向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以10mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有MN-001的媒介物。

[0127] 组4 (MN-001-中剂量):向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以30mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有MN-001的媒介物。

[0128] 组5 (MN-001-高剂量):向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以100mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有MN-001的媒介物。

[0129] 组6 (替米沙坦):向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以10mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有替米沙坦的纯水。

[0130] 所有组中的小鼠将在12周龄被处死用于下面的试验。测量个体肝重,计算肝体比。通过水解方法对肝羟脯氨酸进行定量。进行肝切片的组织病理学分析(根据常规方法):HE染色(评估NAFLD活性评分)、天狼星红(Sirius-red)染色(评估纤维化面积的百分比)、F4/80免疫染色(评估炎症面积的百分比)、 α -SMA免疫染色(评估 α -SMA阳性面积的百分比)。对于TIMP-1、I型胶原、 α -SMA、5-脂氧合酶、FLAP和LTC4合酶,利用总RNA从肝实时PCR分析中进行基因表达分析。统计检验使用Bonferroni多重比较检验进行。P值<0.05被认为是统计学显著的。

[0131] 实施例2:人类中的晚期NASH的治疗

[0132] 250名具有与晚期非酒精性脂肪性肝炎相关的症状的成人被随机分配以接受MN-001或MN-002(各自的每日剂量为500mg)或者安慰剂持续长达6个月。主要结果是按照利用脂肪变性、小叶炎症、肝细胞鼓胀、肝硬化和纤维化中的一者或多者的标准化评分的组合(composite)评估的非酒精性脂肪性肝炎的组织学特性改善。根据本领技术人员众所周知的方法分析该结果。

[0133] 实施例3:MN-001在晚期非酒精性脂肪性肝炎的STAM模型中的治疗有益效果

[0134] STAMTM是通过在C57BL/6小鼠中的化学和膳食干预组合创建的晚期非酒精性脂肪性肝炎(晚期NASH)、其症状及相关的肝病征的有用模型。在该实施例中,在诱导NASH后,允许达到晚期,并在8-12周对小鼠进行治疗。替米沙坦已显示在STAM小鼠中具有抗NASH、抗纤维化和抗炎性作用,并因此在本研究中用作阳性对照。根据本研究且如下文所述,用替米沙坦进行的治疗与媒介物组相比同报道数据一致显著减少肝重量、NAS、纤维化面积和炎症面积,从而提供了如本文采用的STAM小鼠模型用于说明本发明所用的化合物有用性的有用性的证据。

[0135] 用高剂量和中剂量的MN-001进行的治疗显著降低NAFLD活性评分(NAS)。NAS的改善归因于小叶炎症和肝细胞鼓胀的减轻。值得注意的是,高剂量和中剂量的MN-001显著降低了鼓胀评分。结果证明,例如且不受限制,MN-001可以通过抑制肝细胞损伤和鼓胀来改善晚期NASH病状。就其本身而言,MN-001在晚期NASH阶段显示出抗NASH和抗纤维化作用。

[0136] 材料和方法

[0137] 受试物

[0138] 为了制备给药溶液,将MN-001称重并溶解于0.3% CMC(媒介物)中。替米沙坦(Micardis®)购自Boehringer Ingelheim GmbH(德国)并且溶解于纯水中。

[0139] 诱导NASH

[0140] 在出生后2天且用高脂膳食(HFD,57kcal%脂肪,cat#:HFD32,CLEA Japan,日本)饲喂4周龄后通过单次皮下注射200 μ g链脲霉素(STZ,Sigma-Aldrich,美国)溶液在50只雄性小鼠中诱导NASH。

[0141] 药物施用途径

[0142] 媒介物、MN-001和替米沙坦以10mL/kg的量通过经口途径施用。

[0143] 治疗剂量

[0144] MN-001以10mg/kg、30mg/kg和100mg/kg的剂量每日施用一次。替米沙坦以10mg/kg的剂量每日施用一次。

[0145] 动物

[0146] 研究中采用C57BL/6小鼠(怀孕15天的雌性)。

[0147] 环境

[0148] 在可控的温度($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度($45\% \pm 10\%$)、光照(12小时人造光和黑暗循环; 8:00至20:00光照)和换气条件下在SPF设施中维持动物。在实验室内维持高压以预防设施污染。

[0149] 动物管理

[0150] 将动物饲养在聚碳酸酯笼KN-600(Natsume Seisakusho,日本)中,其中每笼最多4只小鼠。灭菌的Paper-Clean(日本SLC)用作垫草并每周替换一次。

[0151] 饮食

[0152] 灭菌的固体HFD自由提供,置于笼顶部上的金属盖内。从水瓶任意地提供纯水,该水瓶配备有橡皮塞和吸管。将水瓶每周替换一次、清洗并在高压釜内灭菌和再使用。

[0153] 动物和笼识别

[0154] 小鼠由雕刻在耳饰上的数字来识别。将每个笼用专用识别码标记。

[0155] 肝生物化学的测量

[0156] 肝羟脯氨酸含量的测量

[0157] 为了定量肝羟脯氨酸含量,将冷冻肝样品(32mg-40mg)通过碱-酸水解方法如下处理。将肝样品用100%丙酮脱脂、在空气中干燥、在 65°C 下溶解于2N NaOH中并在 121°C 下高压灭菌20分钟。将裂解的样品(400 μL) 在 121°C 下用400 μL 的6N HCl酸水解20分钟,并用含有10mg/mL活性炭的400 μL 的4N NaOH中和。将AC缓冲液(2.2M乙酸/0.48M柠檬酸,400 μL)添加至样品,然后离心以收集上清液。用从16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始的反式-4-羟基-L-脯氨酸(Sigma-Aldrich)的连续稀释液建立羟脯氨酸的标准曲线。将制备的样品和标准品(各为400 μL)与400 μL 氯胺T溶液(Wako Pure Chemical Industries,日本)混合并在室温下孵育25分钟。然后将所述样品与欧立希氏溶液(Ehrlich's solution)(400 μL)混合并在 65°C 下加热20分钟以显现颜色。在冰上冷却样品并离心以去除沉淀后,在560nm下测量每个上清液的光学密度。根据羟脯氨酸标准曲线计算羟脯氨酸浓度。肝样品的蛋白质浓度使用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific,美国)测定并用于标准化经计算的羟脯氨酸值。肝羟脯氨酸水平被表达为 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白质。

[0158] 组织病理学分析

[0159] 对于HE染色,从于布安氏溶液(Bouin's solution)中预固定的肝组织的石蜡块上进行切片,并用Lillie-Mayer苏木精(Muto Pure Chemicals,日本)和曙红溶液(Wako Pure Chemical Industries)染色。NAFLD活性评分(NAS)根据克莱纳标准计算(Kleiner DE.等 Hepatology, 2005;41:1313)。为了使胶原沉积可视化,布安氏固定的肝切片使用天狼星红(picro-Sirius red)溶液(Waldeck,德国)进行染色。

[0160] 对于免疫组织化学,从包埋在组织-Tek O.C.T.化合物中并在丙酮中固定的冷冻肝组织进行切片。内源性过氧化物酶活性使用0.03% H₂O₂阻断5分钟,然后用Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma, 日本) 孵育10分钟。将切片在室温下用抗- α -SMA (Epitomics, 美国) 或抗-F4/80抗体 (BMA Biomedicals, 瑞士) 的200倍稀释液孵育1小时。在用二抗 (HRP-山羊抗-大鼠抗体, Invitrogen, 美国) 孵育后,使用3,3'-二氨基联苯胺/H₂O₂溶液 (Nichirei, 日本) 进行酶-底物反应。

[0161] 对于纤维化面积、炎症面积和 α -SMA半定量的定量分析,在中央静脉周围使用数码相机 (DFC280; Leica Microsystems, 德国) 以200倍放大捕获天狼星红染色的切片、F4/80-免疫染色的切片和 α -SMA-免疫染色的切片的明场图像,并且5个视野/切片中的阳性面积使用ImageJ软件 (美国国立卫生研究院) 测量。

[0162] 定量RT-PCR

[0163] 总RNA从肝样品中使用RNAiso (Takara Bio, 日本) 根据制造商的说明进行提取。1 μ g的RNA使用于20 μ L最终体积中含有4.4mM MgCl₂ (F. Hoffmann-La Roche, 瑞士)、40U RNA酶抑制剂 (Toyobo, 日本)、0.5mM dNTP (Promega, 美国)、6.28 μ M随机六聚体 (Promega)、5 $\times$ 第一链缓冲液 (Promega)、10mM二硫苏糖醇 (Invitrogen, 美国) 和200U MMLV-RT (Invitrogen) 的反应混合物进行逆转录。反应在37 $^{\circ}$ C下进行1小时,然后在99 $^{\circ}$ C下进行5分钟。使用实时PCR DICE和SYBR预混合液Taq (Takara Bio) 进行实时PCR。为了计算相对mRNA表达水平,将每个基因的表达标准化为参照基因36B4 (基因符号: Rplp0) 的表达。PCR-引物对的信息描述于表1中。

[0164] 表1. PCR引物信息

[0165]

基因	引物对ID	序列
36B4	MA057856	正向 5'-TTCCAGGCTTTGGGCATCA-3'
		反向 5'-ATGTTTCAGCATGTTTCAGCAGTGTG-3'
TIMP-1	MA069519	正向 5'-TGAGCCCTGCTCAGCAAAGA-3'
		反向 5'-GAGGACCTGATCCGTCACAA-3'
I型胶原	MA075477	正向 5'-CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGAG-3'
		反向 5'-GCAATGCTGTTCTTGCAGTGGTA-3'
α -SMA	MA057911	正向 5'-AAGAGCATCCGACACTGCTGAC-3'
		反向 5'-AGCACAGCCTGAATAGCCACATAC-3'
5-脂氧合酶	MA148345	正向 5'-TTGGCATCTAGGTGCAGTGTG-3'
		反向 5'-TGCGGAATCGGATCATGG-3'
FLAP	MA159311	正向 5'-CGGACTGATGTACCTGTTTGTGAG-3'
		反向 5'-ATCCGCTTGCCGAAGATGTAG-3'
LTC4合酶	MA085965	正向 5'-CTGTGGCTGGCAACATGAAG-3'
		反向 5'-CCTTCGTGCAGAGATCACCTGTAG-3'

[0166] 统计检验

[0167] 统计分析使用GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, 美国) 上的Bonferroni多重比较检验进行。P值<0.05被认为是统计学显著的。当单尾t-检验回到P值<0.10时,假定趋

势或倾向。结果被表达为平均值±SD。

[0168] 实验设计和治疗

[0169] 研究组

[0170] 组1:正常

[0171] 向十只正常小鼠自由饲喂正常膳食而不经任何治疗直至12周龄。

[0172] 组2:媒介物

[0173] 向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以10mL/kg的量每日一次经口施用媒介物。

[0174] 组3:MN-001-低剂量

[0175] 向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以10mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有MN-001的媒介物。

[0176] 组4:MN-001-中剂量

[0177] 向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以30mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有MN-001的媒介物。

[0178] 组5:MN-001-高剂量

[0179] 向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以100mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有MN-001的媒介物。

[0180] 组6:替米沙坦

[0181] 向十只NASH小鼠从8周龄至12周龄以10mg/kg的剂量每日一次经口施用补充有替米沙坦的纯水。

[0182] 表2汇总了治疗方案。

[0183] 表2. 治疗方案

[0184]

组	小鼠 数目	小鼠	受试物	剂量 (mg/kg)	量 (mL/kg)	方案	处死 (周)
1	10	正常	-	-	-	-	12
2	10	STAM	媒介物	-	10	经口, 每天一次, 8周-12周	12
3	10	STAM	MN-001	10	10	经口, 每天一次, 8周-12周	12
4	10	STAM	MN-001	30	10	经口, 每天一次, 8周-12周	12
5	10	STAM	MN-001	100	10	经口, 每天一次, 8周-12周	12
6	10	STAM	替米沙坦	10	10	经口, 每天一次, 8周-12周	12

[0185] 动物监测和处死

[0186] 每日监测存活力、临床体征和行为。在治疗前记录体重。在每次施用后大约60分钟观察小鼠的毒性、濒死和死亡的显著临床体征。将动物通过经由在醚麻醉(Wako Pure Chemical Industries)下直接心脏穿刺的驱血法处死。

[0187] 结果

[0188] 组织学分析

[0189] HE染色和NAFLD活性评分 (NAS)

[0190] NAFLD活性评分 (NAS) 是对例如在患有晚期NASH的对象中的肝损伤的程度和受损肝对于治疗的响应的程度的测量。图1中示出了HE染色的切片的代表性显微照片。来自媒介物组的肝切片展现出严重的微观和宏观囊泡脂肪沉积、肝细胞鼓胀和炎性细胞浸润。与这些观察一致,与正常组相比,在媒介物组中NAS显著升高。所有剂量的MN-001治疗组显示出肝细胞鼓胀和炎性细胞浸润的显著改善。与媒介物组相比,在所有剂量的MN-001治疗组中,NAS显著降低。参见下面的表3和表4,以及图2-5。

[0191] 表3. 通过MN-001对NAS和NAS组成的改善

[0192]

组	n	评分											NAS
		脂肪变性				小叶炎症				肝细胞鼓胀			
						0	1	2	3	0	1	2	
正常	10	10	-	-	-	10	-	-	-	10	-	-	0.0±0.0
媒介物	10	-	6	4	-	-	4	5	1	-	-	10	5.1±0.7
MN-001-低	10	3	6	1	-	2	2	6	-	-	6	4	3.6±1.4
MN-001-中	10	-	7	3	-	1	6	3	-	-	5	5	4.0±0.9
MN-001-高	10	-	9	1	-	4	5	1	-	-	7	3	3.1±0.7
替米沙坦	9	2	7	-	-	2	5	2	-	-	9	-	2.8±0.8

[0193] 表4

[0194] NAS成分的定义

	项	评分	程度
		0	<5%
	脂肪变性	1	5-33%
		2	>33-66%
		3	>66%
		0	无
[0195]	肝细胞鼓胀	1	几乎无鼓胀细胞
		2	许多细胞/显著鼓胀
		0	无病灶
		1	<2 个病灶/200x
	小叶炎症	2	2-4 个病灶/200x
		3	>4 个病灶/200x

[0196] 天狼星红染色

[0197] 图6中示出了天狼星红染色的肝切片的代表性显微照片。与正常组相比,来自媒介物组的肝切片显示肝小叶的中心周围区域内的胶原沉积增加。与正常组相比,在媒介物组中的纤维化面积(天狼星红-阳性面积)的百分比显著增加。与媒介物组相比,在替米沙坦组、MN-001-低组和MN-001-高组中纤维化面积显著减小。与媒介物组相比,在MN-001-中剂量组中纤维化面积倾向于减小。参见表5和图7。

[0198] F4/80免疫染色

[0199] 与正常组相比,来自媒介物组的肝切片显示肝小叶中F4/80-阳性细胞的数目和尺寸增加。与正常组相比,在媒介物组中炎症面积(F4/80-阳性面积)的百分比显著增加。替米沙坦组中炎症面积倾向于减小。尽管从图8中可以看出改善,但媒介物组与任何剂量的MN-001治疗组之间的炎症面积没有显著差异。同样参见表5。

[0200] α -SMA免疫染色

[0201] 图9中示出了 α -SMA免疫染色的切片的代表性显微照片。与正常组相比,来自媒介物组的肝切片显示肝小叶中 α -SMA-阳性细胞的数量增加。与正常组相比,在媒介物组中 α -SMA-阳性面积的百分比显著增加。与媒介物组相比,在替米沙坦组、MN-001-低组和MN-001-高组中 α -SMA-阳性面积显著减小。媒介物组与MN-001-中组之间的 α -SMA-阳性面积没有显著差异。参见表5和图9。

[0202] 表5.组织学分析

[0203]

参数	正常	媒介物	MN-001-低	MN-001-中	MN-001-高	替米沙坦
(平均值±SD)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=9)
天狼星红-阳性面积 (%)	0.29±0.13	1.21±0.44	0.75±0.40	0.95±0.37	0.65±0.28	0.49±0.19
F4/80-阳性面积 (%)	2.92±0.70	5.76±1.60	6.47±2.67	6.36±1.59	5.14±0.89	3.79±1.60
α-SMA-阳性面积 (%)	0.49±0.12	0.85±0.35	0.45±0.11	0.76±0.19	0.48±0.21	0.35±0.14

[0204] 基因表达分析

[0205] TIMP-1

[0206] 与正常组相比,在媒介物组中TIMP-1mRNA表达水平显著上调。与媒介物组相比,在MN-001-低组和替米沙坦组中TIMP-1mRNA表达水平显著下调。媒介物组与任何其它组之间的TIMP-1mRNA表达水平没有显著差异。

[0207] 1型胶原

[0208] 与正常组相比,在媒介物组中1型胶原mRNA表达水平显著上调。与媒介物组相比,在替米沙坦组中1型胶原mRNA表达水平显著下调。与媒介物组相比,MN-001-高组1型胶原mRNA表达水平倾向于降低。媒介物组与任何其它组之间的1型胶原mRNA表达水平没有显著差异。

[0209] α-SMA

[0210] 与正常组相比,在媒介物组中α-SMA mRNA表达水平显著上调。与媒介物组相比,在替米沙坦组中α-SMA mRNA表达水平显著下调。媒介物组与任何剂量的MN-001治疗组之间的α-SMA mRNA表达水平没有显著差异。

[0211] 5-脂氧合酶

[0212] 与正常组相比,在媒介物组中5-脂氧合酶mRNA表达水平倾向于增加。与媒介物组相比,在MN-001-高组和替米沙坦组中5-脂氧合酶mRNA表达水平倾向于降低。媒介物组与MN-001低组和MN-001中组之间的5-脂氧合酶mRNA表达水平没有显著差异。

[0213] FLAP

[0214] 与正常组相比,在媒介物组中FLAP mRNA表达水平显著上调。与媒介物组相比,在MN-001-高组中FLAP mRNA表达水平倾向于增加。媒介物组与任何其它组之间的FLAP mRNA表达水平没有显著差异。

[0215] LTC4合酶

[0216] 与媒介物组相比,在替米沙坦组中LTC4合酶mRNA表达水平倾向于降低。媒介物组与任何其它组之间的LTC4合酶mRNA表达水平没有显著差异。

[0217] 体重变化和一般情况

[0218] 在治疗期间在除了替米沙坦组之外的所有组中体重逐渐增加。在整个治疗期间,

媒介物组的平均体重低于正常组的平均体重。从第8天至第28天,替米沙坦组的平均体重显著低于媒介物组的平均体重。在治疗期间,媒介物组与任何剂量的MN-001治疗组之间的平均体重没有显著差异。在第24天,替米沙坦组中的一者发现死亡。没有动物显示一般情况恶化。

[0219] 处死当天的体重

[0220] 与正常组相比,媒介物组显示处死当天的平均体重显著降低。与媒介物组相比,替米沙坦组显示处死当天的平均体重显著降低。媒介物组与任何剂量的MN-001治疗组之间的处死当天的平均体重没有显著差异。

[0221] 肝重量和肝与身体的重量比

[0222] 与正常组相比,媒介物组显示平均肝重量显著增加。与媒介物组相比,替米沙坦组显示平均肝重量显著减小。媒介物组与任何剂量的MN-001治疗组之间的平均肝重量没有显著差异。

[0223] 与正常组相比,媒介物组显示平均肝与身体的重量比显著增加。与媒介物组相比,替米沙坦组显示平均肝与身体的重量比显著降低。媒介物组与任何剂量的MN-001治疗组之间的平均肝与身体的重量比没有显著差异。

[0224] 肝生物化学

[0225] 肝羟脯氨酸含量

[0226] 与正常组相比,媒介物组肝羟脯氨酸含量倾向于增加。媒介物组与任何其它组之间的肝羟脯氨酸含量没有显著差异。

[0227] 虽然已阐明且描述了某些实施方式,但应当理解,根据本领域的普通技能可以在其中进行改变和修改,而不脱离如下面的权利要求所限定的在其更广泛的方面中的技术。

[0228] 在没有未被本文明确公开的任何一个元素或多个元素、一个限制或多个限制的情况下,本文用作说明而描述的实施方式可适当地被实行。因此,例如,术语“包含(comprising)”、“包括(including)”、“含有(containing)”等应开放性地理解,而不受限制。此外,本文所用的术语和表述已被用作描述而非限制的措辞,且没有意图使用排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同物的这类术语和表述,但应认识到,在所要求保护的技术的范围内可以进行各种修改。此外,短语“基本上由……组成”应被理解成包括那些明确列举的元素和那些不会实质上影响所要求保护的的技术的基本的且新颖的特征的额外元素。短语“由……组成”排除任何未指明的元素。

[0229] 本申请不受限于本申请中所描述的特定实施方式。正如对于本领域的技术人员显而易见的,可以进行许多修改和变动,而不脱离其宗旨和范围。对于本领域的技术人员来说,除了本文所列举的那些方法和组合物之外,在本申请的范围内的功能上等同的方法和组合物从前面的描述中将是显而易见的。这种修改和变动意图落在所附的权利要求的范围内。本申请仅受限于所附的权利要求项,连同这些权利要求有权要求的等同物的全部范围。应当理解,本申请不受限于无疑可以变化的特定的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统。也应当理解,本文所用的用辞仅是出于描述特定实施方式的目的,而非用于限制。

[0230] 此外,根据马库什群组描述本申请的特征或方面,本领域的技术人员将认识到,本申请也因此根据马库什群组的任何个体成员或成员的子群组而被描述。

[0231] 如将被本领域的技术人员所理解,出于任何目的和全部目的,尤其在提供文字说

说明书方面,本文所公开的所有范围也包含任何和所有的可能的子范围及其子范围的组合。任何所列出的范围可以容易地被认为充分地描述相同的范围和使相同的范围能够分解成至少相等的两等份、三等份、四等份、五等份、十等份等。作为非限制性实施例,本文所讨论的每个范围可容易地分解成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如将被本领域的技术人员所理解,所有诸如“多达”、“至少”、“大于”、“小于”等的措辞包括所引用的数字且指的是可随后被分解成如上所讨论的子范围的范围。最后,如将被本领域的技术人员所理解,范围包括各个单独的成员。

[0232] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请、授权专利和其他文献通过引用并入本文,犹如各个单独的出版物、专利申请、授权专利或其他文献被明确地且单独地表明通过引用以其全文并入。被包含在通过引用并入的文字中的定义在它们与本申请中的定义矛盾的意义上被排除在外。

[0233] 在权利要求中陈述了其他实施方式。

HE染色的肝切片的显微照片

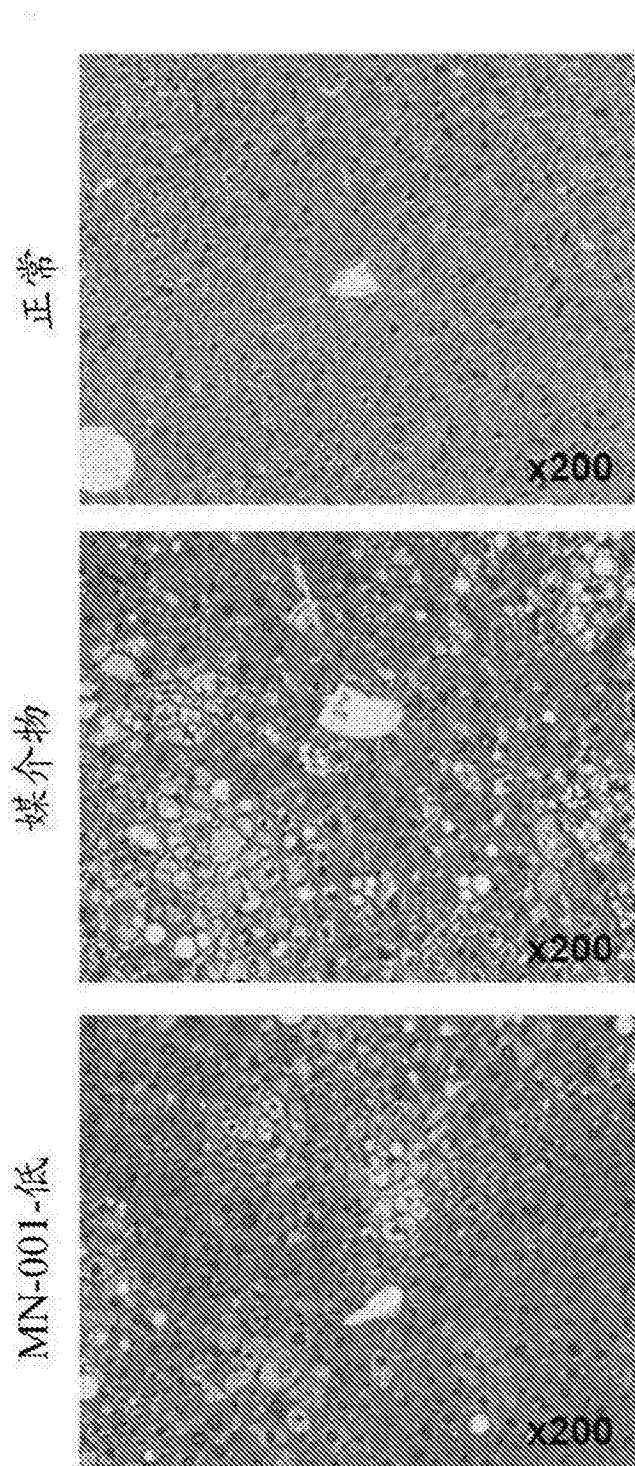
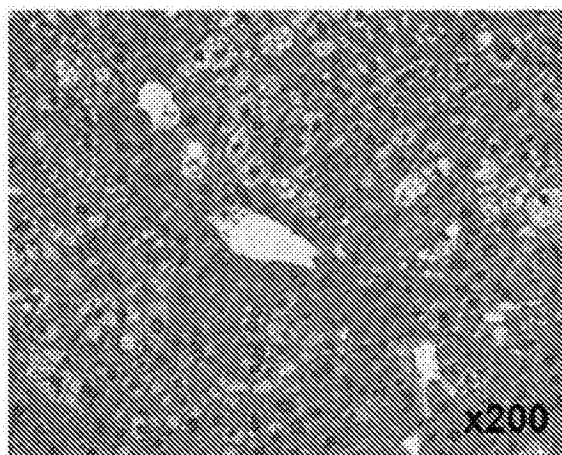
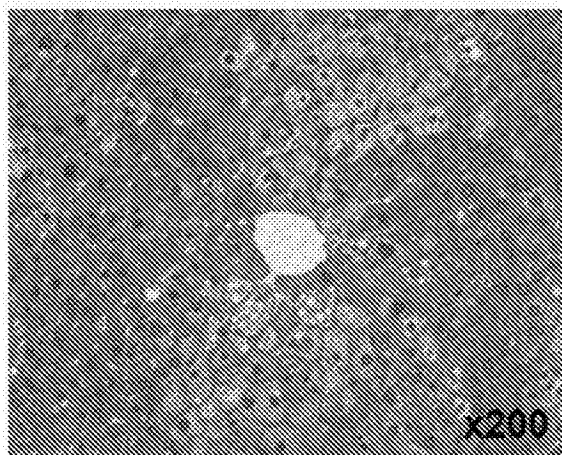


图1A

MN-001-中



MN-001-高



替米沙坦

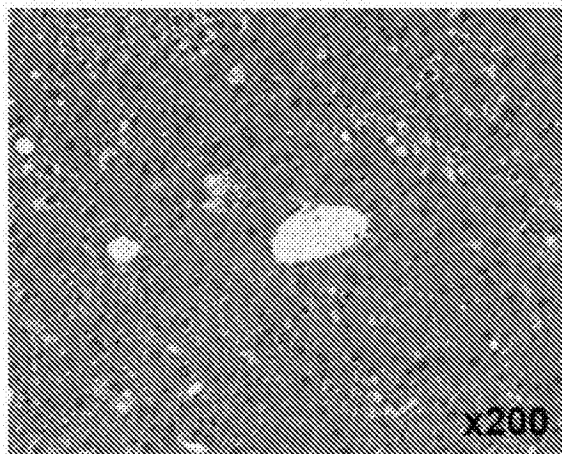


图1B

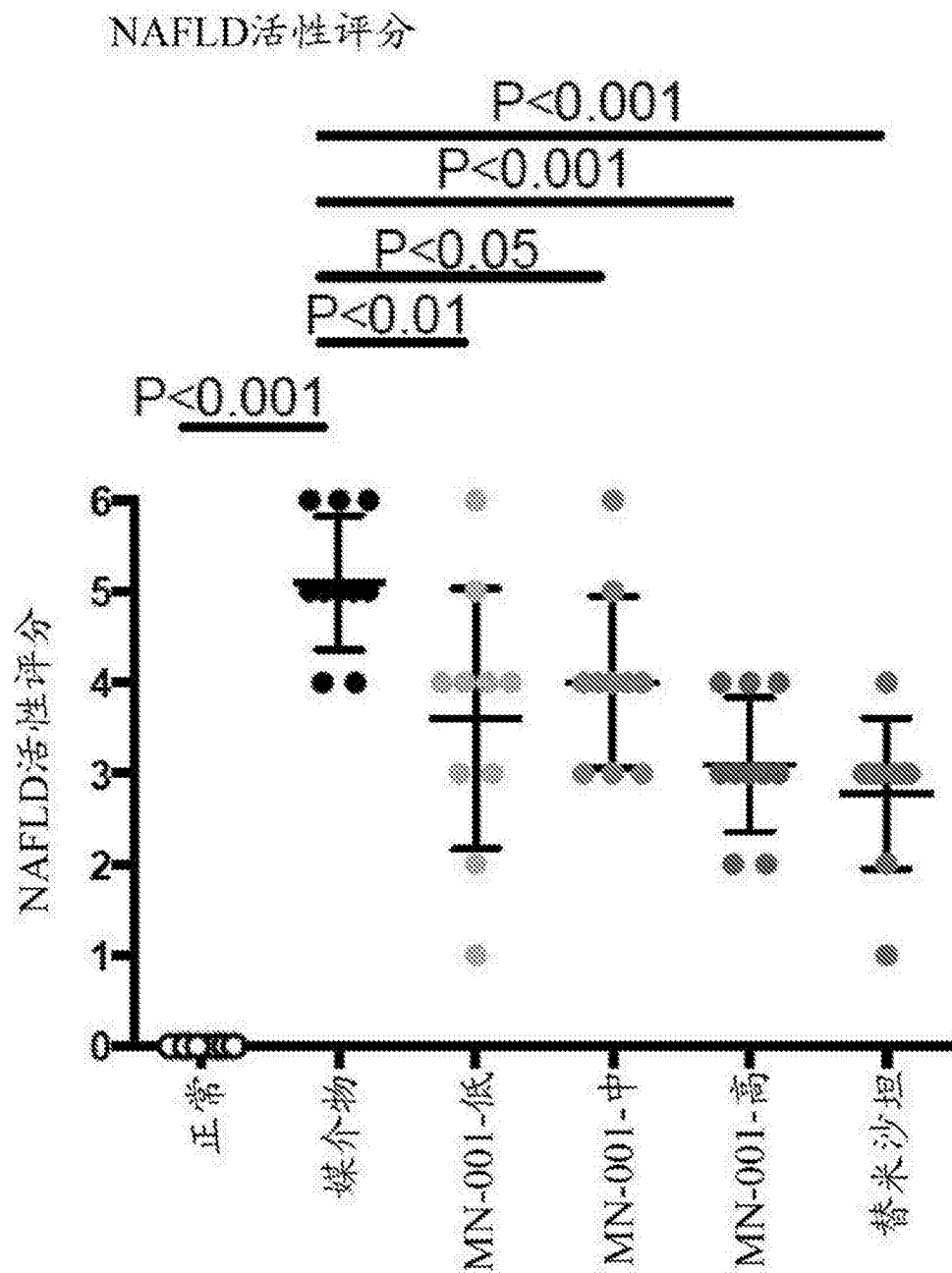


图2

脂肪变性评分

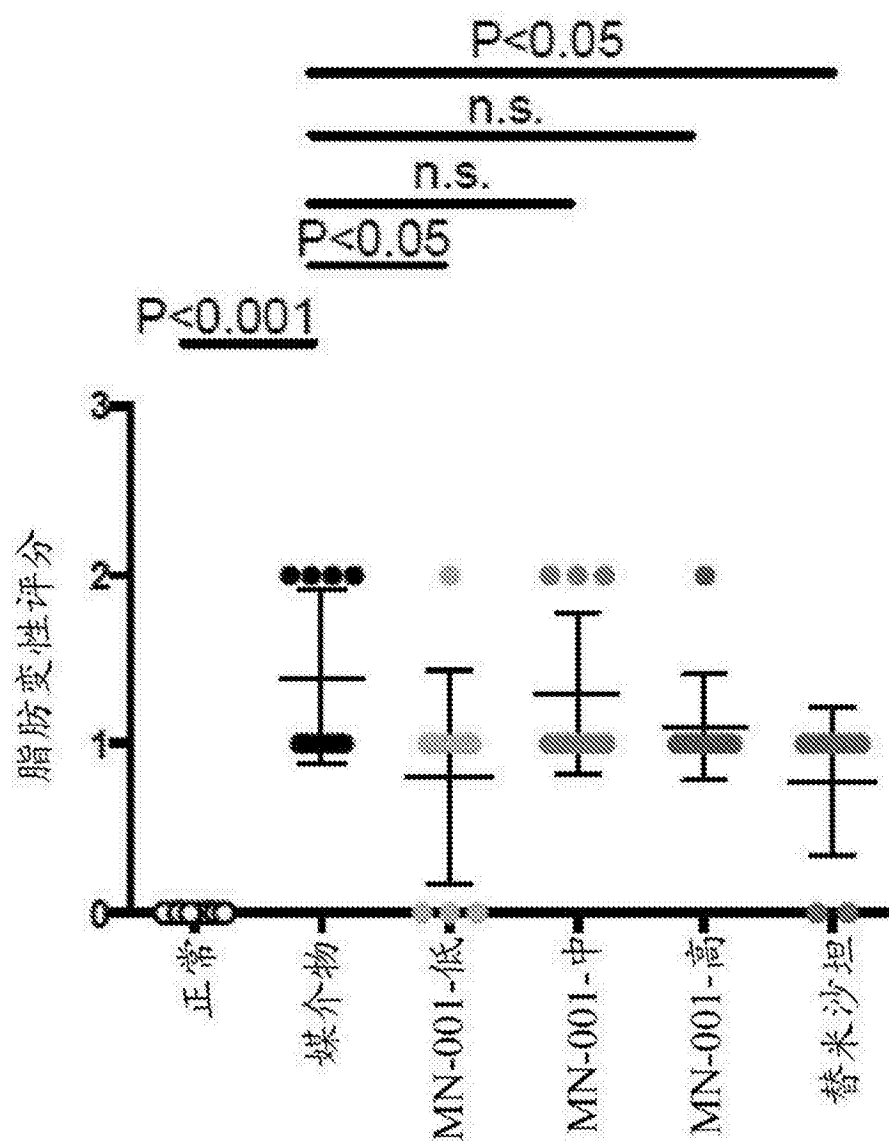


图3

小叶炎症评分

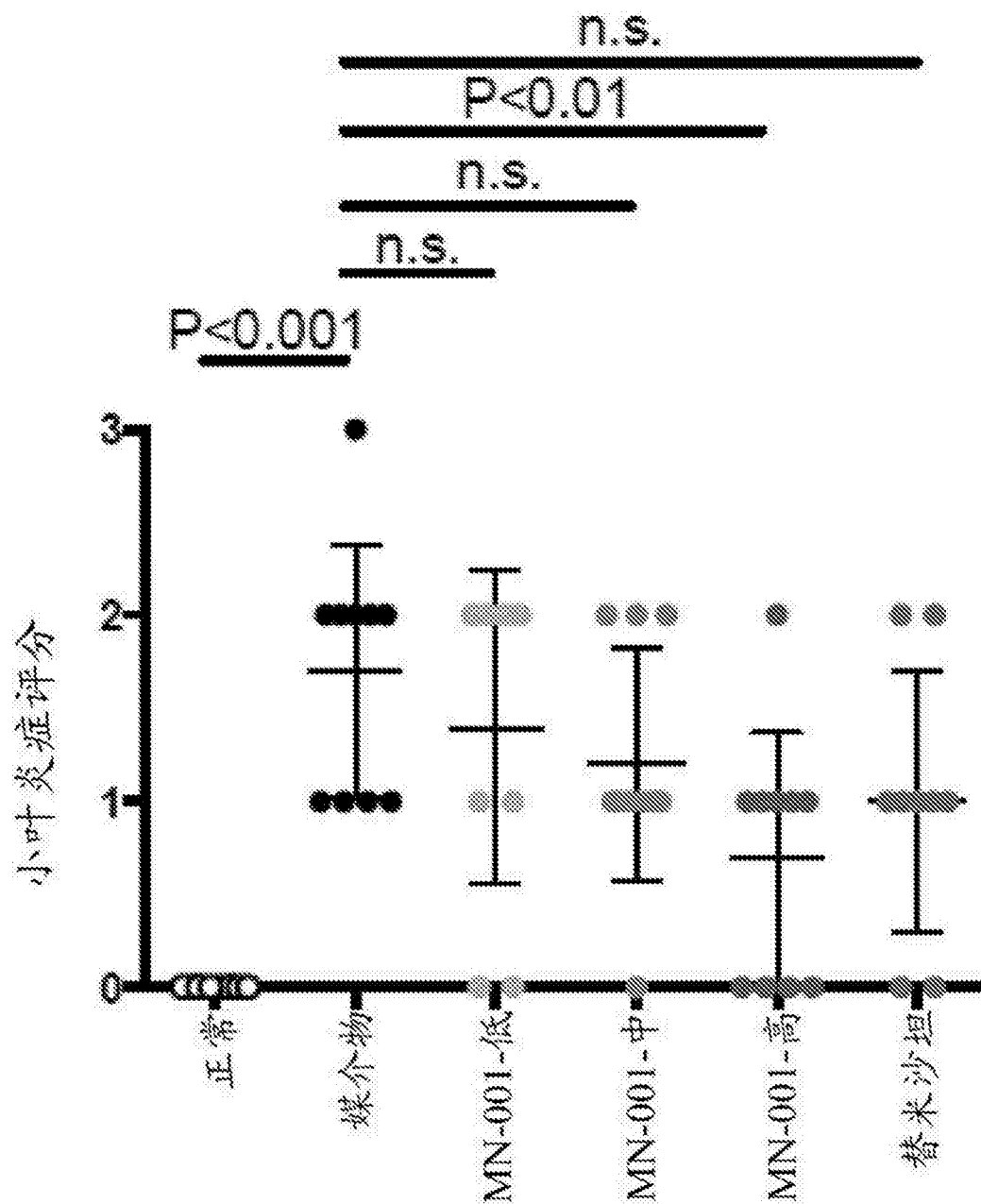


图4

肝细胞鼓胀评分

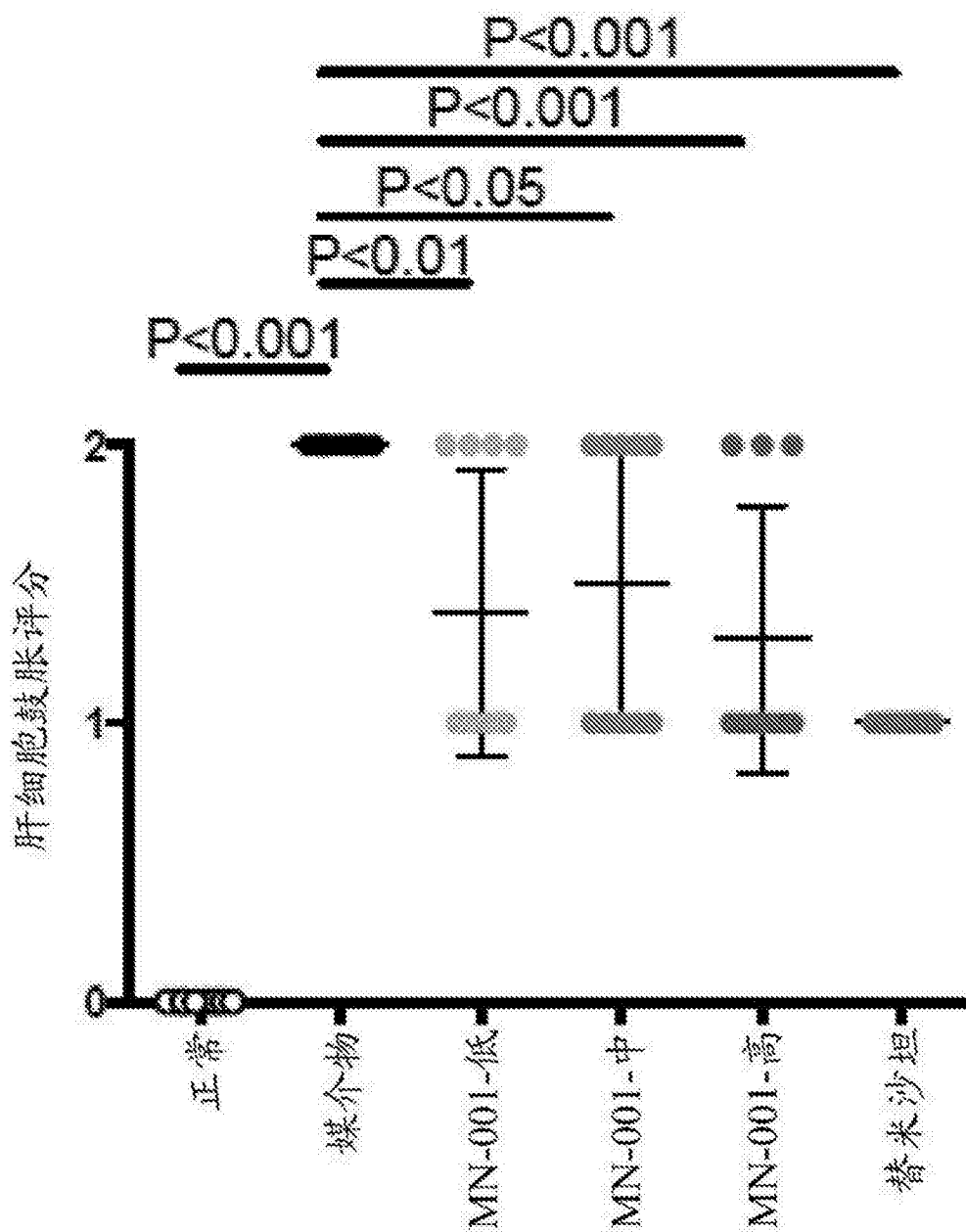


图5

天狼星红染色的肝切片的显微照片

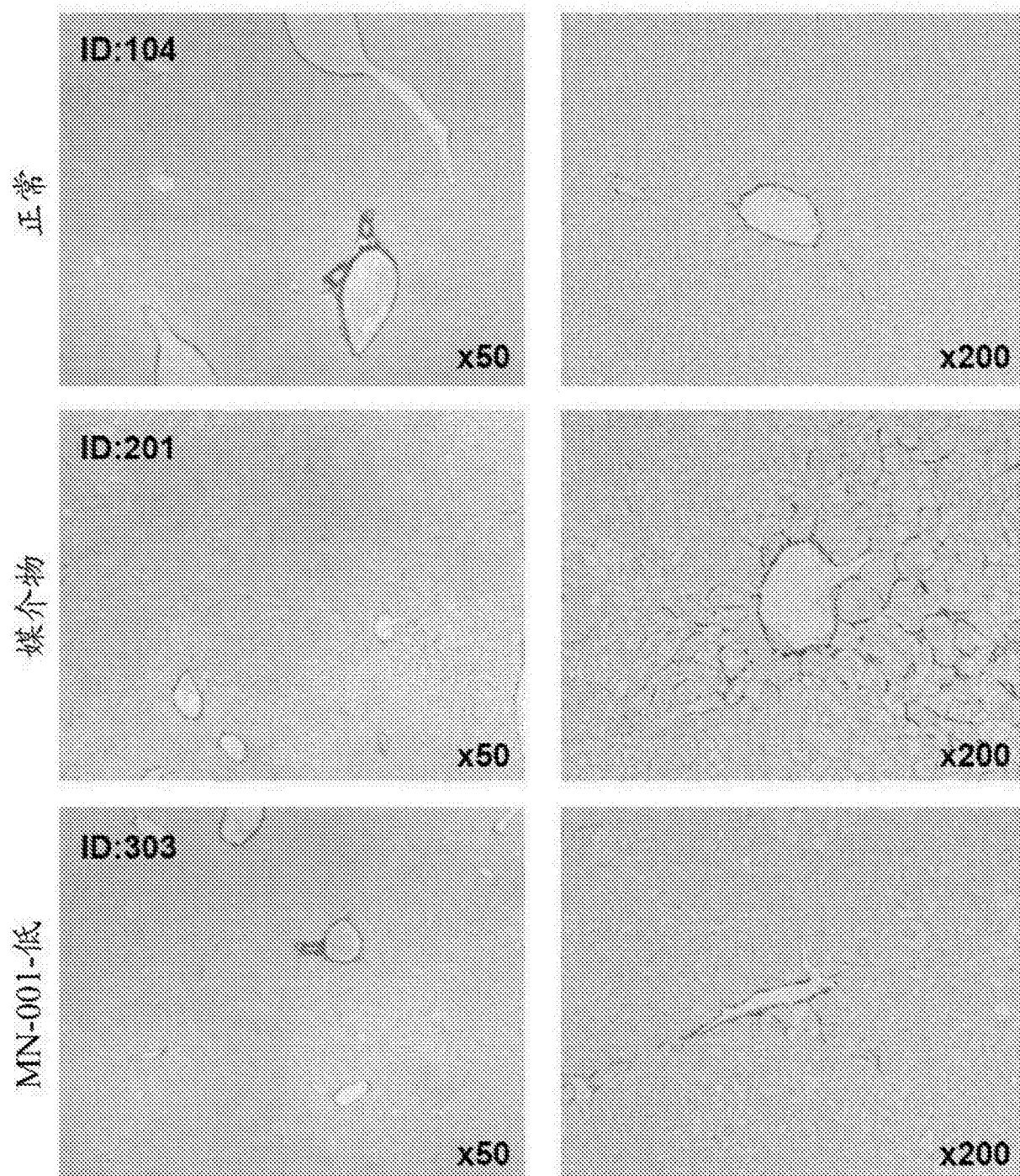


图6A

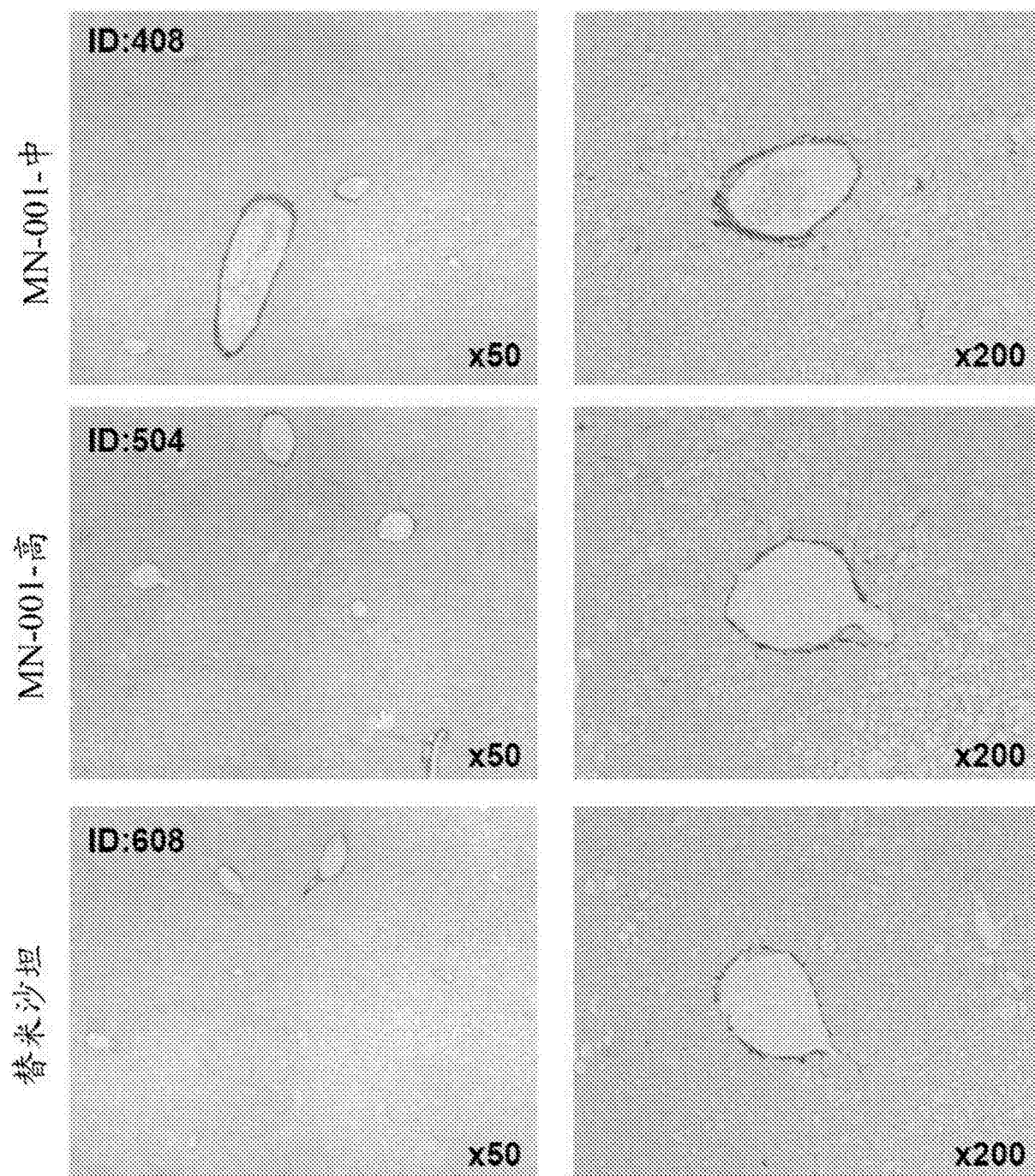


图6B

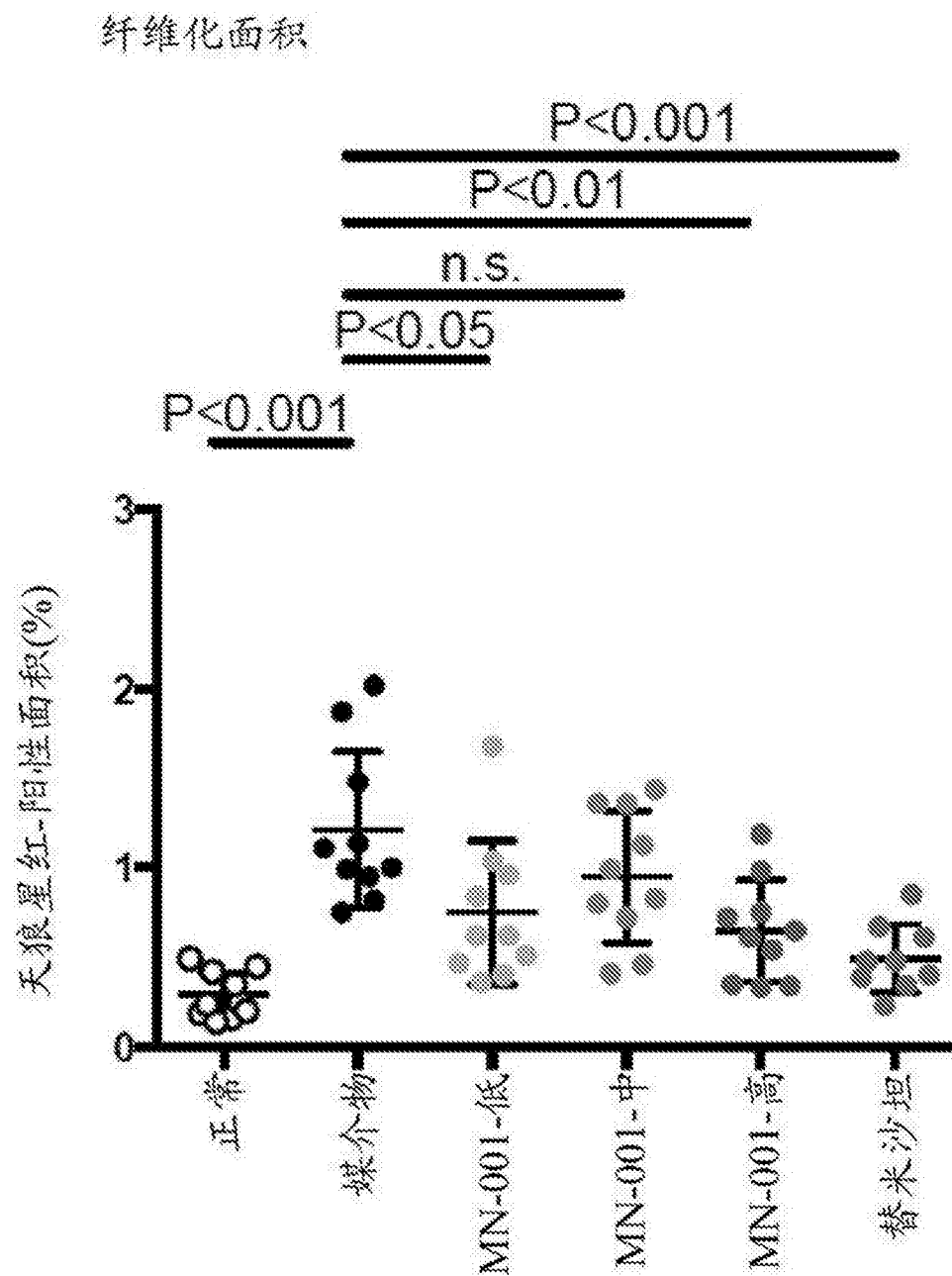


图7

经治疗的肝的炎症面积

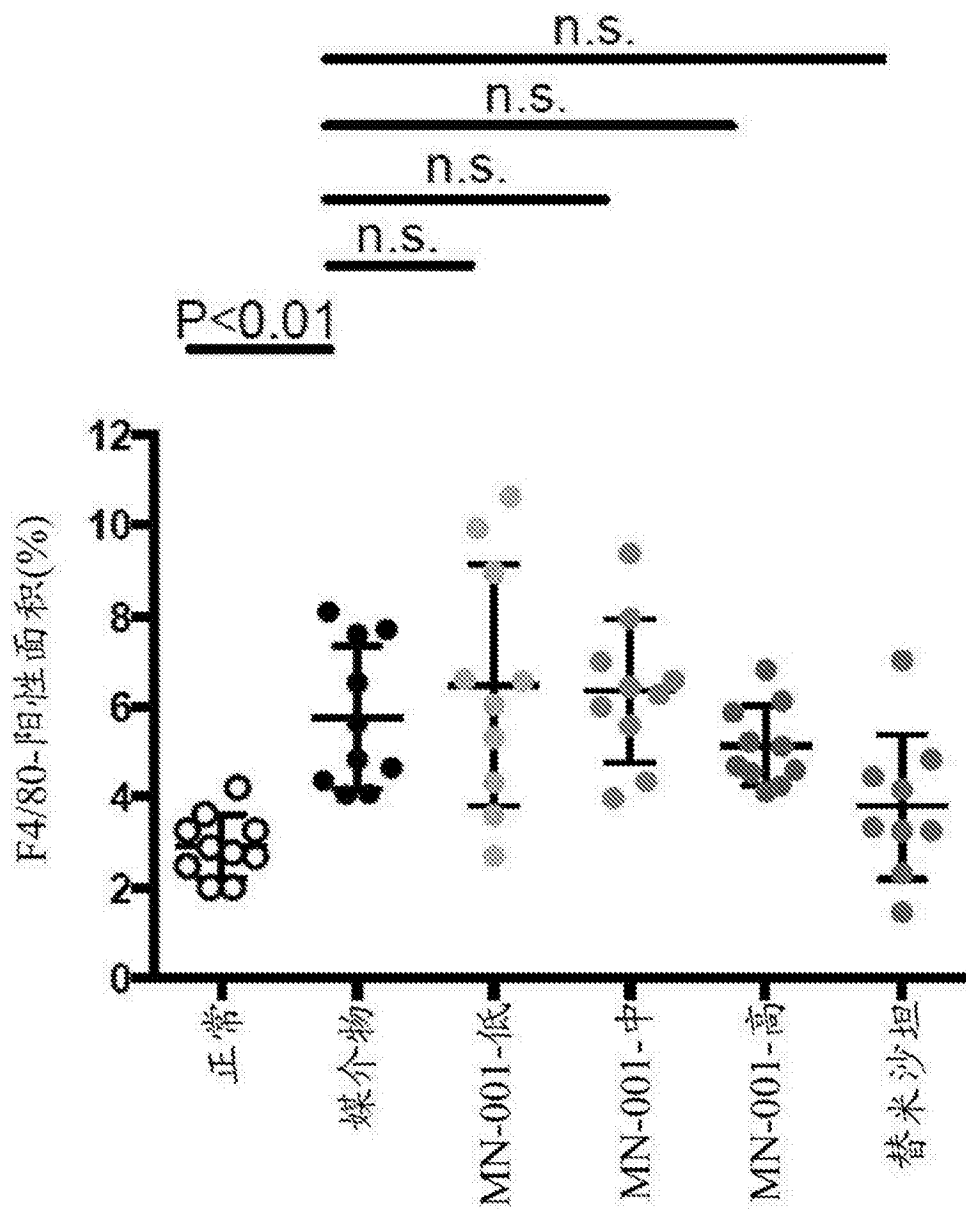
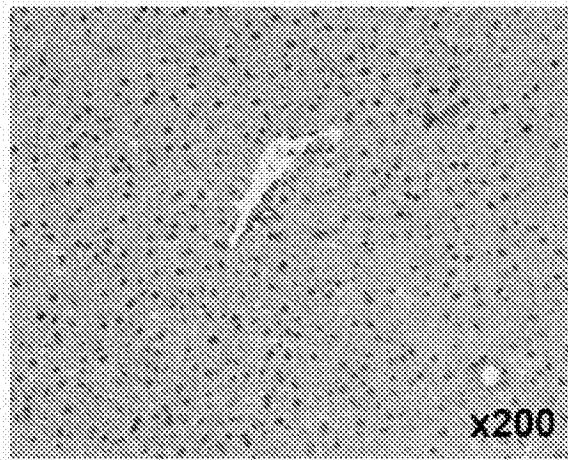


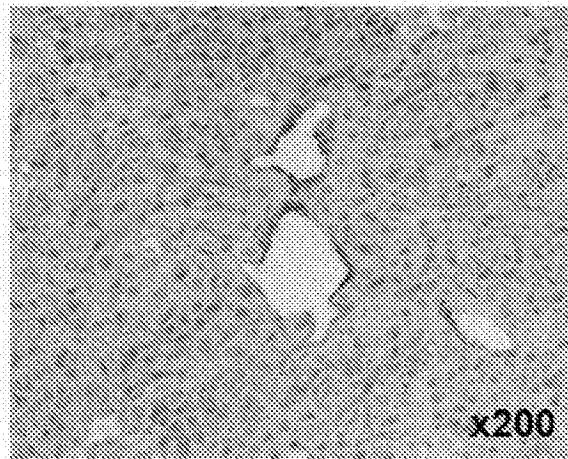
图8

α -SMA免疫染色的肝切片的显微照片

正常



媒介物



MN-001-低

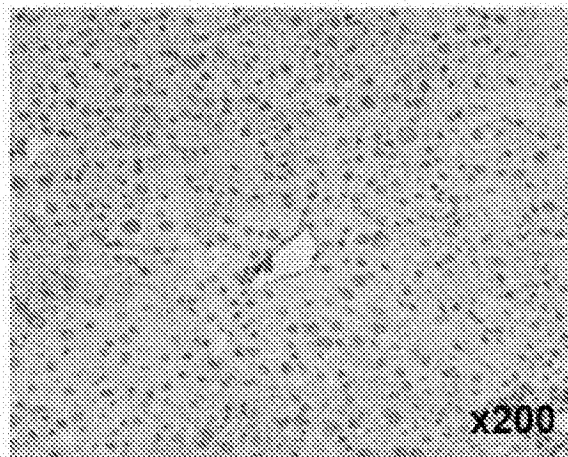
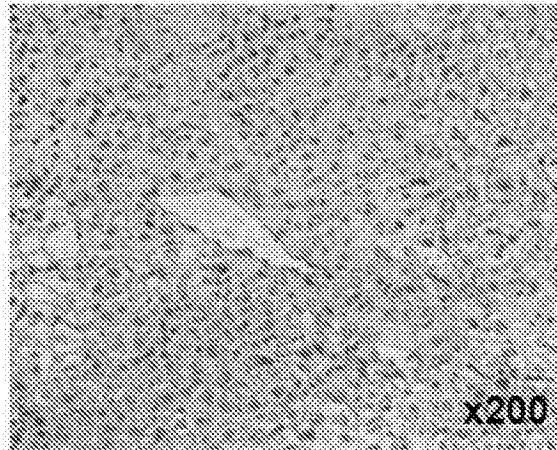
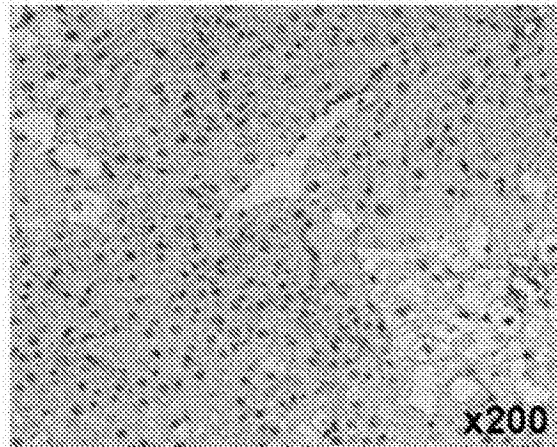


图9A

MN-001-中



MN-001-高



替米沙坦

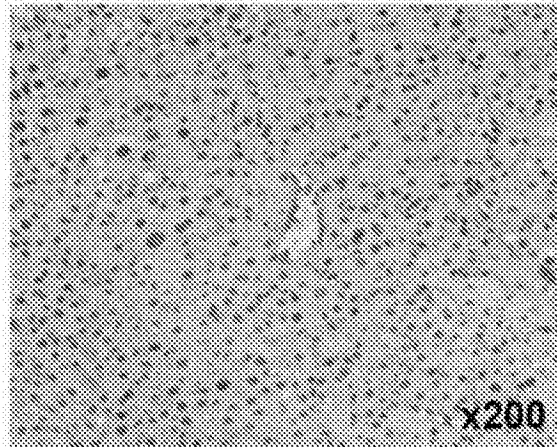


图9B