(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104254327 A
(43)申请公布日 2014.12.31

(21)申请号 201380010765.7
(22)申请日 2013.02.08
(30)优先权数据
12425027.5 2012.02.09 EP
61/644,544 2012.05.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.08.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/052617 2013.02.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/117744 EN 2013.08.15
(71)申请人 诺格拉制药有限公司
地址 爱尔兰都柏林
(72)发明人 S·巴罗尼 S·贝林维亚 F·维提
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 袁泉
(51)Int.Cl.
A61K 31/196(2006.01)
A61K 31/343(2006.01)
A61K 31/357(2006.01)
A61P 1/04(2006.01)

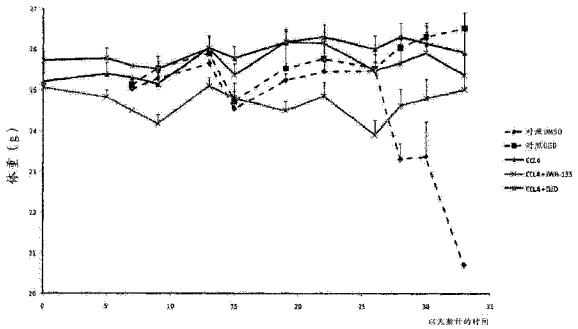
权利要求书2页 说明书27页 附图16页

(54)发明名称

治疗纤维化的方法

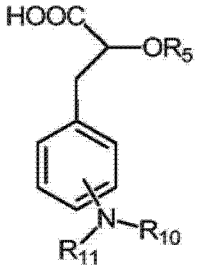
(57)摘要

本发明公开部分涉及治疗纤维化的方法，例如肝纤维化和/或肠纤维化，该方法包括向有需要的患者施用有效量的本发明公开的化合物。



CN 104254327 A

1. 一种用于预防或治疗纤维化的方法，该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的式 A 所示的化合物，及其药学可接受的盐：

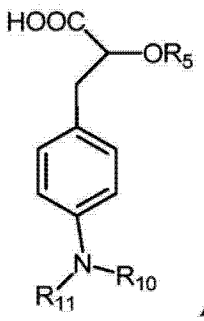
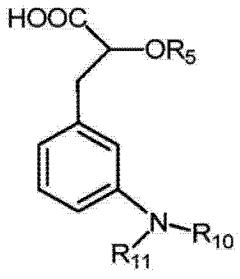


R_{10} 选自 H 和 C_1-C_6 烷基；

R_{11} 选自 H、C_1-C_6 烷基和 -C(O)-C_1-C_6 烷基；

R_5 为 H 或 C_1-C_6 烷基。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的化合物由式 A' 或 A" 表示：

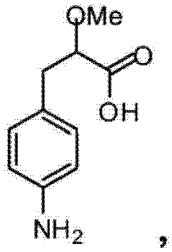
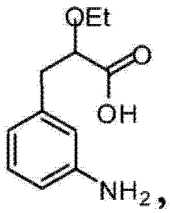
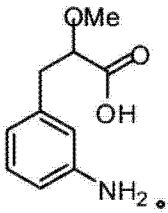

A';

A"。

3. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中 R_5 为甲基、乙基、丙基或异丙基。

4. 权利要求 3 所述的方法，其中 R_5 为甲基。

5. 权利要求 4 所述的方法，其中 R_{10} 和 R_{11} 均为 H。

6. 权利要求 1 所述的方法，其中所述的化合物选自下列化合物，及其药学可接受的盐：


，

，

。

7. 一种用于预防或治疗纤维化的方法，该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的化合物，其中所述的化合物选自：化合物 20，化合物 21，2- 甲氧基 -3-(4'- 氨基苯基）丙酸；2- 乙氧基 -3-(4'- 氨基苯基）丙酸（化合物 39）；6- 氨基 -2,2- 二甲基 -4H- 苯并 [1,3] 二噁英 -4- 酮；5- 氨基 -N- 羟基 -2- 甲氧基苯甲酰胺；和 5- 氨基 -2,3- 二氢苯并呋喃 -7- 羧酸，及其药学可接受的盐和立体异构体。

8. 权利要求 1-7 的任意一项所述的方法，其中所述的纤维化为肝纤维化。

9. 权利要求 1-7 的任意一项所述的方法，其中所述的纤维化为肠纤维化。

10. 权利要求 1-7 的任意一项所述的方法，其中所述的纤维化选自：肾纤维化、心纤维化、心内膜心肌纤维化、特发性肺纤维化、髓纤维化、腹膜后纤维化和 / 或肾源性系统纤维化。

11. 一种用于预防或治疗肝纤维化的方法，该方法包括向有需要的患者施用药学有效量的药学制备物，该制备物包括 PPARγ 试剂，其中所述的 PPARγ 试剂选自：化合物 20，化合物 21，2- 甲氧基 -3-(4’- 氨基苯基）丙酸；2- 乙氧基 -3-(4’- 氨基苯基）丙酸；6- 氨基 -2,2- 二甲基 -4H- 苯并 [1,3] 二噁英 -4- 酮；5- 氨基 -2,3- 二氢苯并呋喃 -7- 羧酸，及其药学可接受的盐和立体异构体。

12. 权利要求 11 所述的方法，其中所述的药学制备物以口服方式施用。

13. 权利要求 11 或 12 所述的方法，其中所述的患者为人类。

14. 权利要求 11-13 的任意一项所述的方法，其中所述的患者目前正遭受或已经遭受乙型肝炎或丙型肝炎。

15. 权利要求 11-14 的任意一项所述的方法，其中所述的患者患有肝硬化。

16. 权利要求 11-13 的任意一项所述的方法，其中所述的患者还遭受克罗恩病、炎性肠病或溃疡性结肠炎。

17. 权利要求 11-17 的任意一项所述的方法，其中所述的药学制备物包括 2- 甲氧基 -3-(4’- 氨基苯基）丙酸。

治疗纤维化的方法

[0001] 本申请要求 2012 年 2 月 9 日提交的 EP12425027.5 和 2012 年 5 月 9 日提交的 U.S.S.N.61/644,544 的优先权，这些申请均以引用方式全文并入本文。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含以文本格式电子提交的序列表，并在此通过引用将其全部并入本文。所述文本的拷贝，产生于 2013 年 5 月 21 日，名称为 PS966PCT_SL.txt，大小为 3,284 字节。

背景技术

[0004] 纤维化通常是由于损伤或长期炎症使得在修复或反应过程中（例如愈合）过多的纤维结缔组织在器官或组织中形成。纤维化使得受影响的组织硬化和 / 或肿胀，并减少流体通过这些组织的流动。结果，纤维化的组织不能适当地发挥作用。

[0005] 例如，肝纤维化可以描述为对由于例如酒精和 / 或药品滥用、病毒和寄生虫感染（例如肝炎，如乙肝或丙肝）、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、铁和铜过量、以及自身免疫疾病所导致的慢性肝损伤而产生的伤口愈合应答。所有的慢性肝病都能导致肝纤维化，主要导致慢性病毒性乙型肝炎和酒精性肝病。肝内源性大麻素系统通过激活不同的信号传递途径来调节促纤维生成和抗纤维生成作用，其中所述的信号传递途径不同地影响成纤维发生细胞的增殖和死亡。经过一段时间，上述过程可以导致肝硬变，肝硬变中，肝脏的功能单位的结构组织被破坏，使得血液流过肝脏并使肝脏功能被破坏。

[0006] 肝脏纤维化代表了具有世界性重要意义的、共同的且艰难的挑战。目前，对晚期肝硬化的唯一根治性疗法是移植，但是即使在发达国家， 可利用的供者器官的数量和潜在接受者的临床状况限制了该技术的应用。纤维化的发展，特别是肝硬化 (cirrhosis)，关系到显著的发病率和死亡率。因此，非常必要研发可应用于肝脏纤维化的抗纤维化策略。

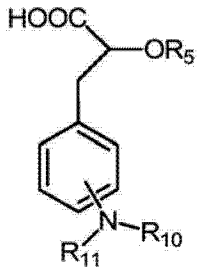
[0007] 肾纤维化作为原发性获得性损害而导致显著的发病率和死亡率，这种损害需要透析或肾脏移植。纤维化可以在肾单位（肾脏的功能单位）的过滤或重吸收部位发生。纤维化还可以在心脏中发生，例如心纤维化可以以心脏瓣膜增厚的形式发生。

[0008] 肠纤维化为炎性肠病 (IBD) 的常见的并发症，炎性肠病可以是有症状的，并且如果继发肠狭窄，则需要手术干预。构成肠纤维化的传统和新的许多机制与慢性炎症有关。

[0009] 发明概述

[0010] 例如本发明提供了用于治疗纤维化的方法，该方法包括向患者给与本文所公开的化合物。此外，本发明还提供了在所述方法中使用的化合物。例如本发明提供了在有需要或遭受肝纤维化和 / 或肠纤维化的受试对象或患者中，预防或治疗肝纤维化和 / 或肠纤维化的方法，该方法包括施用治疗和 / 或药学可接受的量的下列化合物、及其药学可接受的盐：

[0011]



[0012] 其中：

[0013] R_{10} 选自 H 和 C_1-C_6 烷基；

[0014] R_{11} 选自 H、C_1-C_6 烷基和 -C(O)-C_1-C_6 烷基；

[0015] R_5 为 C_1-C_6 烷基。

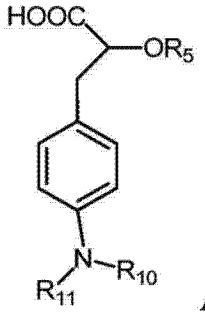
[0016] 合适地，在一些实施方案中，R_5 可以为 H。

[0017] 合适地，R_{10}、R_{11} 和 / 或 R_5 的 C_1-C_6 烷基官能团可以独立地选自：甲基、乙基、丙基、戊基和己基。烷基官能团可以是线性的或分支的。甲基和乙基烷基官能团是特别优选的，并且甲基是最优选的烷基官能团。

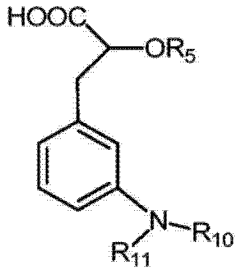
[0018] 合适地，氮可以在 2'、3'、4' 或 5' 位置与环连接。优选的是，氮在 3' 或 4' 的位置连接。4' 位置是最优选的。

[0019] 示例性的预期化合物可以包括式 A' 和 A"，其中 R_{10}、R_{11} 和 R_5 在上文和此处提供：

[0020]



A'；



A"。

[0021] 合适地，在一些实施方案中，R_5 可以为 H。

[0022] 合适地，R_{10}、R_{11} 和 / 或 R_5 的 C_1-C_6 烷基官能团可以独立地选自：甲基、乙基、丙基、戊基和己基。烷基官能团可以是线性的或分支的。甲基和乙基烷基官能团是特别优选的，并且甲基是最优选的烷基官能团。在某些实施方案中，R_5 是甲基、乙基、丙基或者为例如甲基。在某些实施方案中，R_5 为甲基、乙基、丙基或者为例如甲基。

[0023] 此外，本发明提供了预防或治疗肝或肠纤维化的方法，该方法包括向有需要的受试对象施用包含 PPAR γ 试剂（例如本发明公开的化合物）的药学制备物。本发明考虑了预防或治疗肾纤维化、心纤维化、心内膜心肌纤维化、特发性肺纤维化、髓纤维化、腹膜后纤维化和 / 或肾源性系统纤维化的方法，该方法包括向有需要的患者施用包含 PPAR γ 试剂（例如本发明公开的化合物）的药学制备物。例如本发明公开的方法可以包括其中患者为人类的方法。因此，本文描述的化合物可以用于治疗和 / 或预防这些疾病 / 状况。

[0024] 通过考虑以下附图、发明详述和权利要求，本公开的这些和其他方面、以及益处将变得显而易见。

附图说明

[0025] 图 1 描绘了在施用 CCl_4、JWH-133 和化合物 34 时，小鼠的体重演变。

[0026] 图 2(A) 描绘了 metavir 评分的说明，(B) 描绘了 CCl_4、JWH-133+CCl_4 和化合物 34+CCl_4 对肝脏的作用并对各组说明了 metavir 评分。

[0027] 图 3(A) 描绘了 metavir 评分，(B) 采用了由接受 CCl_4、JWH-133+CCl_4 和化合物 34+CCl_4 的小鼠的肝脏的 metavir 评分。

[0028] 图 4 描绘了 CCl_4、JWH-133+CCl_4 和化合物 34+CCl_4 对 α-SMA 和胶原蛋白 -1 的作用。

[0029] 图 5 描绘了肠纤维化研究的时间表。

[0030] 图 6 描绘了化合物 34 对患有肠纤维化的小鼠的结肠的作用。

[0031] 图 7 描绘了化合物 34 对患有肠纤维化的小鼠的结肠的抗炎作用。

[0032] 图 8 描绘了化合物 34 对患有肠纤维化的小鼠的结肠的作用。

[0033] 图 9 描绘了采用对纤维化的主要标志物（胶原蛋白 I-III、CTGF、SMAD2/3、PDGF、α-SMA 和 TGF-β1）的免疫组织化学分析，化合物 34 对患有肠纤维化的小鼠的结肠的作用。

[0034] 图 10 描绘了采用 Western 印迹分析，化合物 34 对患有肠纤维化的小鼠的结肠的作用。

[0035] 图 11 示出了在使用 DSS 和 DSS+GED 处理的小鼠中的体重曲线。

[0036] 图 12 示出了与接受常规水的对照小鼠相比，在使用 DSS 和 DSS+GED 处理的小鼠的结肠中，纤维化的水平。

[0037] 图 13 描绘了由 DSS 和 DSS+GED 小鼠慢性结肠炎得到的结肠的纤维发现。结肠组织固定于 4% PFA 中，并使用 May-Grunwald-Giemsa(H&E) 和马松三色染料对横截面 (4μm) 进行染色。与对照相比，在粘膜下层和浆膜中，DSS 小鼠显示出严重的炎症程度和纤维化，而 GED 处理测定了正常肠壁结构的恢复。数据表示为平均值 ±SEM ;* = $p<0.05$;** = $p<0.01$ 并且 *** = $p<0,005$ 对比 H_2O。

[0038] 图 14 显示出纤维化的主要标志物的免疫组织化学和免疫印迹。纤 维照片显示与患有 DSS 诱导的慢性结肠炎的小鼠相比，在使用 GED 处理的 DSS 小鼠中，胶原蛋白 I-III(a)、α-SMA(b) 显著减少。此外，通过 Western 印迹测量这些标志物的蛋白质水平，从而证明由 GED 诱导的表达图谱。代表性的印迹被示出。* = $p<0,05$,** = $p<0,01$。对照组，N = 6 只小鼠 ;DSS 组，N = 8 只小鼠 ;DSS+GED 组，N = 8 只小鼠。

[0039] 图 15 描绘了显微照片，其示出与患有 DSS 诱导的慢性结肠炎的小鼠相比，在使用 GED 处理的 DSS 小鼠中，TGF-β1(a)、SMAD2/3(b) 和 CTGF(c) 显著减少。

[0040] 图 16 示出了施用 GED 对慢性 DSS 处理的小鼠中的 IL-13 蛋白质水平、以及其下游调节剂 (TGF-β1 和 CTGF) 的作用，并且通过 Western 印迹分析测定 IL-13、TGF-β1 和 CTGF 的蛋白质水平。数据以平均对照值的百分率表示。代表性的印迹被示出。** = $p<0,01$。对照组，N = 6 只小鼠 ;DSS 组，N = 8 只小鼠 ;DSS+GED 组，N = 8 只小鼠。

[0041] 发明详述

[0042] 本发明公开的内容部分地基于这样的发现 :本发明公开的某些化合物在例如肝脏或结肠中具有预防或治疗纤维化的能力。在一个方面中，本发明公开的内容涉及在有需要的患者中预防或治疗纤维化（例如肝纤维化和 / 或肠纤维化）的方法。所公开的方法包括

施用本发明公开的化合物。

[0043] 在进一步描述前，在说明书、实施例和所附的权利要求中使用的某些术语均收集于此。这些定义应该根据本发明公开的其余部分阅读，并按照本领域的技术人员那样理解。除非另作说明，本发明使用的所有技术和科学术语均具有本领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0044] 通过题述方法治疗的“患者”、“受试对象”或“宿主”可以指人类或非人类动物，例如小型哺乳动物，如小鼠或大鼠，包括马、牛、狗、猫等。

[0045] 术语“治疗试剂”是本领域公认的，并且指任何化学部分，其是生物学、生理学或药理学活性物质，并且在受试对象中局部和 / 或系统性作用。治疗试剂（也称为“药品”）在公知的参考文献中有所描述，例如 the Merck Index、the Physicians Desk Reference 和 The Pharmacological Basis of Therapeutics，并且治疗试剂包括但不限于药剂；维生素；矿物补充剂；用于治疗、预防、诊断、治愈或缓解疾病或病情的物质；影响机体的结构或功能的物质；或前药，其在置于生理环境中之后具有生物学活性或具有更强的活性。

[0046] 术语“治疗作用”是公认的，并且指在动物、特别是哺乳动物、更具体而言由药物活性物质引起的人类中的局部和 / 或系统性作用。因此，该术语是指在动物或人类中用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防疾病或增强所需的生理或精神发展和 / 或状况的任何物质。短语“治疗有效量”是指在可应用于任何治疗的合理的利益 / 风险比下，所述物质产生一些所需的局部或系统性作用的量。此类物质的治疗有效量将随着所治疗的受试对象和疾病状况、受试对象的体重和年纪、疾病状况的严重性、施用的方式等而改变，该量可以由本领域的任一普通技术人员容易地测定。例如本发明的某些组合物可以足以产生可应用于此类治疗的合理的利益 / 风险比的量来施用。

[0047] 术语“治疗”是公认的，并且指治愈及减轻任何状况或疾病的至少一种症状。

[0048] 术语“烷基”是本领域公认的，并且包括饱和的脂肪族基团，包括直链烷基基团、支链烷基基团、环烷基（脂环族）基团、烷基取代的环烷基基团及环烷基取代的烷基基团。在某些实施方案中，支链或支链烷基在其主链中具有大约 30 个或更少的碳原子（例如直链为 C_1-C_{30}，支链为 C_3-C_{30}），并且备选地，大约 20 或更少的碳原子，例如 1 至 6 个碳。同样，环烷基在它们的环结构中具有大约 3 至大约 10 个碳原子，备选地在它们的环结构中具有大约 5、6 或 7 个碳原子。术语“烷基”还定义为包括卤素取代的烷基。

[0049] 此外，术语“烷基”（或“低级烷基”）包括“取代的烷基”，其是指具有取代基的烷基部分，其中所述的取代基替代了碳氢化合物主链的一个或多个碳上的氢。此类取代基可以包括例如羟基、羰基（例如羧基、烷氧羰基、甲酰基或乙酰基）、硫代羰基（例如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯）、烷氧基、磷酰基、膦酸酯、亚膦酸酯、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷基硫代、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰、磺酰氨基、磺酰、杂环、芳烷基、芳香族或杂芳香族部分。本领域的那些技术人员应该理解的是如果合适，碳氢化合物链上取代的部分本身可以被取代。例如取代的烷基的取代基可以包括氨基、叠氮、亚氨基、酰胺基、磷酰基（包括膦酸酯和亚膦酸酯）、磺酰基（包括硫酸酯、磺酰氨基、氨磺酰和磺酸酯）、甲硅烷基，以及醚、烷基硫代、羰基（包括酮、醛、羧化物和酯）、-CN 等的取代的和未取代的形式。示例性的取代的烷基如下所述。环烷基可以进一步被烷基、烯基、烷氧基、烷基硫代、氨基烷基、羰基取代的烷基、-CN 等取代。

[0050] 术语邻位、间位和对位是本领域公认的，并且分别指 1,2-、1,3- 和 1,4- 二取代的苯。例如名称 1,2- 二甲基苯和邻 - 二甲基苯是同义的。

[0051] 当各种表达的定义（例如烷基、m、n 等）在任何结构中出现不止一次时，其将与同一结构中其他处出现的该定义无关。

[0052] 在本发明的组合物中包含的某些化合物可以以特定的几何或立体异构体形式存在。此外，本发明的化合物还可以是光学活性的。本发明考虑了所有的此类化合物，包括顺式和反式异构体、R- 和 S- 对映异构体、非对映异构体、(D)- 异构体、(L)- 异构体、它们的外消旋混合物、及它们的其他混合物，这些均落入本发明的范围内。其他不对称碳原子可以存在于取代基中，例如烷基基团。所有此类的异构体及其混合物将包含在本发明内。

[0053] 应该理解的是“取代”或“被……取代”包括隐含条件，即，此类取代符合取代原子和取代基的允许化合价，并且取代得到稳定的化合物，例如该化合物不能通过例如重排、环化、消除或其他反应而自发地进 行转化。

[0054] 此外，术语“取代的”还被考虑包含有机化合物的所有允许的取代基。在广义方面中，允许的取代基包括有机化合物的非环状的和环状的、分支的和非分支的、碳环的和杂环的、芳香族的和非芳香族的取代基。示意性取代基包括例如上文所述的那些。允许的取代基可以是用于合适的有机化合物的一个或多个、及相同的或不同的。就本发明的目的而言，诸如氮之类的杂原子可以具有氢取代基和 / 或本文所述的有机化合物的任何允许的取代基，这些取代基满足杂原子的化合价。本发明无意于被有机化合物的允许的取代基以任何方式限定。

[0055] 就本发明的目的而言，根据 the Periodic Table of the Elements, CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 67th Ed., 1986-87（封里）确定化学元素。此外就本发明的目的而言，术语“碳氢化合物”被考虑包括具有至少一个氢原子和一个碳原子的所有允许的化合物。在广义方面中，允许的碳氢化合物包括可以非环状的和环状的、分支的和非分支的、碳环的和杂环的、芳香族的和非芳香族的有机化合物（其可以是取代的或非取代的）。

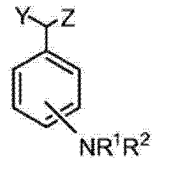
[0056] 术语“药学可接受的盐”是本领域公知的，并且指化合物的相对非毒性的、无机及有机酸加成盐，包括例如在本发明的组合物中所包含的那些。

[0057] 术语“药学可接受的载体”是本领域公认的，并且指药学可接受的材料、组合物或媒介物，例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封材料，其中所述的药学可接受的材料、组合物或媒介物涉及将任何题述组合物或其成分由机体的一个器官或部分携带或运输至机体的另一个器官或部分。就与题述组合物及其成分、且对患者无害的意义而难言，各种载体必须是“可接受的”。可以用作药学可接受的载体的材料的一些实例包括：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、羧乙基纤维素钠和醋酸纤维素；(4) 黄芪胶粉末；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石；(8) 赋形剂，例如可可油和栓剂蜡；(9) 油，例如花生油、 棉花籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇类，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 海藻酸；(16) 无热源的水；(17) 等渗盐水；(18)Ringer 溶液；(19) 乙基醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；以及 (21) 在药物配制物中使用的其他非毒性相容物质。

[0058] 化合物

[0059] 被考虑用于本发明公开的一种或多种方法中的化合物包括式 I 所示的化合物，或者其药学可接受的的盐、对映异构体或立体异构体：

[0060]



(I)

[0061] 其中：

[0062] R^1 和 R^2 均独立地选自 H 和 C_{1-6} 烷基；或者 R^1 和 R^2 可以与它们所连接的氮原子一起形成 5 个或 6 个原子的芳香族或脂肪族环；

[0063] Y 和 Z 独立地选自 H、OH、COOH、$-OR^3$、$-CH(OR_3)COOH$；以及

[0064] R^3 选自 H、苯基、苄基、乙烯基、烯丙基、C_{1-6} 烷基或者被一种或多种卤素取代的 C_{1-6} 烷基；或者其药学可接受的盐。

[0065] 合适地，C_{1-6} 烷基官能团可以独立地选自：甲基、乙基、丙基、戊基和己基。烷基官能团可以是线性的或分支的。甲基和乙基烷基官能团是特别优选的，并且甲基是最优选的烷基官能团。

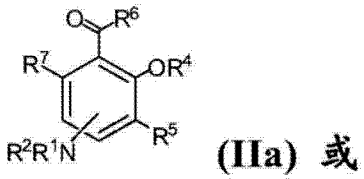
[0066] 在一个实施方案中，Y 可以是 H 或 COOH。例如 Y 可以是 H，而 Z 可以是 $CH(OR^3)COOH$；或者 Y 可以是 COOH，而 Z 可以是 $-OR^3$。在一些实施方案中，R^3 可以是甲基、乙基、n- 丙基或异丙基。

[0067] 在其他的实施方案中，式 I 的 NR^1R^2 部分可以在 4' 位置，或者可以在 3' 位置。在某些实施方案中，R^1 和 R^2 为 H。

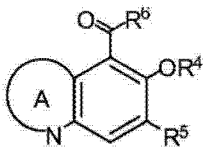
[0068] 合适地，在一些实施方案中，R^3 可以为 H。

[0069] 此外，示例性的化合物包括式 IIa 或 IIb 所示的那些，或者其药学 可接受的盐、对映异构体或立体异构体：

[0070]



(IIa) 或



(IIb)

[0071] 其中：

[0072] R^1 和 R^2 独立地选自 H 和 C_{1-6} 烷基；或者 R^1 和 R^2 可以与它们所连接的氮原子一起形成 5 个或 6 个原子的芳香族或脂肪族环；

[0073] R^6 选自 $-NR^9OH$、OH 和 $-OR^9$；

[0074] R^9 为 C_{1-6} 烷基；

[0075] R^4 选自 H、卤素、苯基、苄基、乙烯基、烯丙基、C_{1-6} 烷基以及被一种或多种卤素取代的 C_{1-6} 烷基；

[0076] R^5 和 R^7 独立地选自氢或卤素；或者

[0077] R^4 和 R^5、或者 R^4 和 R^6 一起，形成 5 个或 6 个原子的稠合杂环，其可任选地被卤素或

C_{1-6} 烷基取代；以及

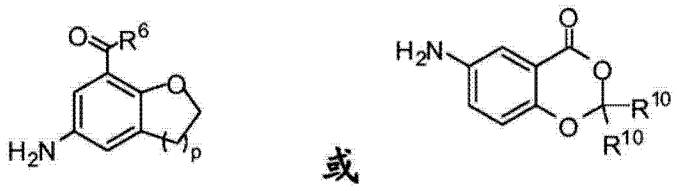
[0078] A 为稠合的杂环，或其药学可接受的盐。

[0079] 合适地，C_1-C_6 烷基官能团可以独立地选自：甲基、乙基、丙基、戊基和己基。烷基官能团可以是线性的或分支的。甲基和乙基烷基官能团是特别优选的，并且甲基是最优选的烷基官能团。

[0080] 在某些实施方案中，式 IIa 的 NR^1R^2 部分可以在 4’ 位置，或者可以在 3’ 位置。在某些实施方案中，R^1 和 R^2 为 H。在一些实施方案中，R^9 可以为甲基、乙基、n- 丙基或异丙基。

[0081] 在一些实施方案中，所考虑的化合物可以由下式表示：

[0082]



[0083] 其中：

[0084] p 为 1 或 2；

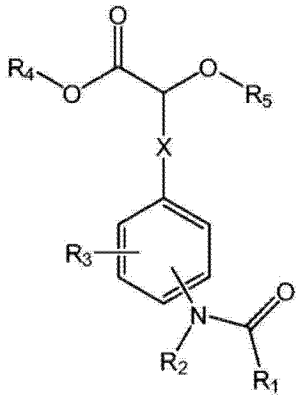
[0085] R^6 选自 OH 或 $-OR^9$；其中 R^9 如上文定义；以及

[0086] 在各种情况下，R^{10} 独立地选自 H、卤素或 C_1-$_6$ 烷基，例如甲基或 乙基。

[0087] 此外，本发明公开至少部分提供了用于本发明公开的方法的、由以下描述的式所示的化合物。

[0088] 例如式 III 的化合物，或者其药学可接受的的盐或 N- 氧化物在此被考虑用于本发明公开的方法：

[0089]



III

[0090] 其中：

[0091] X 为 C_1-C_3 亚烃基，其可任选地被选自卤素或羟基的一个、两个或三个取代基取代；

[0092] R_1 选自 C_1-C_6 烷基、C_3-C_6 环烷基、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基；

[0093] R_2 选自卤素和 C_{1-6} 烷基；

[0094] 在各种情况下，R_3 独立地选自卤素、C_1-C_6 烷氧基、C_1-C_6 烷基、氰基、C_3-C_6 环烷基、卤素、羟基和硝基；

[0095] R_4 选自卤素和 C_1-C_6 烷基；

[0096] R_5 为 C_{1-6} 烷基。

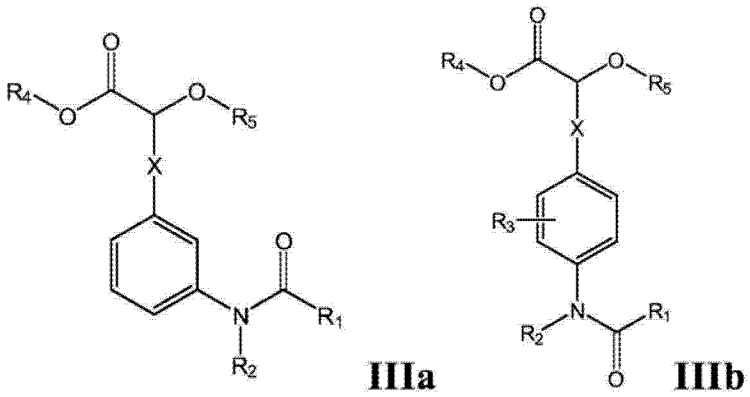
[0097] 合适地，在一些实施方案中，R_5 可以为 H。

[0098] 合适地，C_1-C_6 烷基官能团可以独立地选自：甲基、乙基、丙基、戊基和己基。烷基官能团可以是线性的或分支的。甲基和乙基烷基官能团是特别优选的，并且甲基是最优选的烷基官能团。

[0099] 在一个实施方案中，式 III 的 R_1 可以为 C_1-C_6 烷基，例如甲基。在一个实施方案中，R_2 可以为氢。在另一个实施方案中，R_3 可以选自氢、C_1-C_6 烷基、卤素和羟基。在另一个实施方案中，R_3 可以为氢。在一个实施方案中，R_4 和 R_5 均可以为 C_1-C_6 烷基。在另一个实施方案中，R_4 可以为氢，而 R_5 可以为甲基。在一个实施方案中，X 可以为 $(CH_2)_n$，其中 n 为 1 或 2，例如 1。

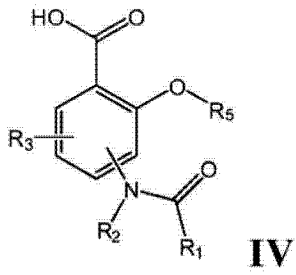
[0100] 在另一个实施方案中，式 III 的部分 $-NR_2-COR_1$ 可以在相对于 X 的间位或对位，如式 IIIa 和 IIIb 所示：

[0101]



[0102] 此外，本发明公开还提供了可以用于本发明公开的方法中的、如下描绘的式 IV 所示的化合物，或者其药学可接受的盐或 N- 氧化物：

[0103]



[0104] 其中：

[0105] R_1 选自 C_1-C_6 烷基、C_3-C_6 环烷基、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基；

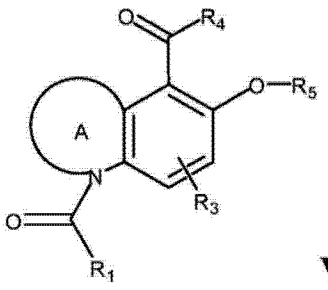
[0106] R_2 选自卤素和 C_1-C_6 烷基；

[0107] 在各种情况下，R_3 独立地选自卤素、C_1-C_6 烷氧基、C_1-C_6 烷基、氰基、C_3-C_6 环烷基、卤素、羟基和硝基；以及

[0108] R_5 为卤素或 C_1-C_6 烷基。

[0109] 此外，还考虑了如下所示的式 V 的化合物：

[0110]



V

[0111] 其中

[0112] R_1 选自 C_1-C_6 烷基、C_3-C_6 环烷基、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基；

[0113] 在各种情况下，R_3 独立地选自卤素、C_1-C_6 烷氧基、C_1-C_6 烷基、氰基、C_3-C_6 环烷基、卤素、羟基和硝基；

[0114] R_4 选自卤素和 C_1-C_6 烷基；

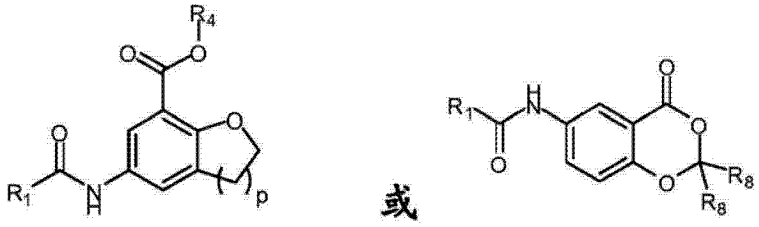
[0115] R_5 为氢或 C_1-C_6 烷基；以及

[0116] A 为稠合的 5 元或 6 元杂环。

[0117] 在一个实施方案中，R_1 可以为 C_1-C_6 烷基，例如甲基。在另一个实施方案中，R_1 和 R_3 均可以为 C_1-C_6 烷基，例如甲基。在一个实施方案中，R_2 可以为氢。

[0118] 在一些实施方案中，化合物可以由下式，或者其药学可接受的盐或 N- 氧化物表示：

[0119]



或

[0120] 其中：

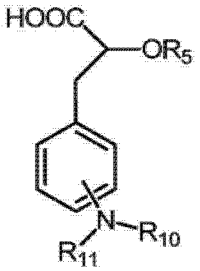
[0121] p 为 1 或 2；

[0122] R_1 选自 C_1-C_6 烷基、C_3-C_6 环烷基、C_2-C_6 烯基和 C_2-C_6 炔基；

[0123] R_4 和 R_8 均独立地选自氢和 C_1-C_6 烷基；

[0124] 例如在一个实施方案中，被考虑用于所公开的方法中的化合物包括式 A 的化合物，或者其药学可接受的盐或 N- 氧化物：

[0125]



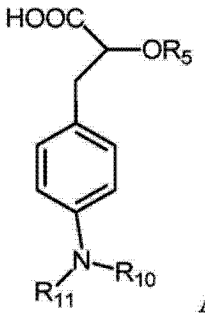
[0126] R_{10} 选自 H 和 C_1-C_6 烷基（例如甲基）；

[0127] R_{11} 选自 H、C_1-C_6 烷基和 -C(O)-C_1-C_6 烷基；（例如 R_{11} 可以为 H、甲基、-C(O)- 甲基或 -C(O)- 乙基）；

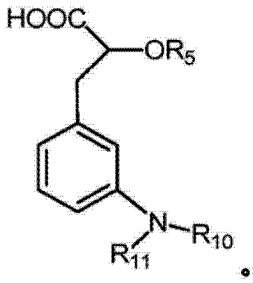
[0128] R_5 为 C_1-C_6 烷基（例如 R_5 可以为甲基、乙基或丙基）。

[0129] 例如式 A’ 和 A” 为在此被考虑用于本发明公开的方法：

[0130]



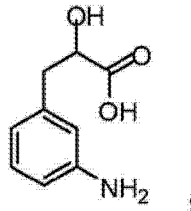
A’；



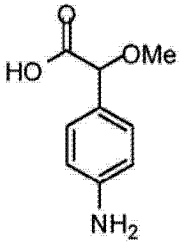
。

[0131] 在此被考虑用于本发明公开的方法中的示例性化合物包括以下化合物，或者其药学可接受的盐：

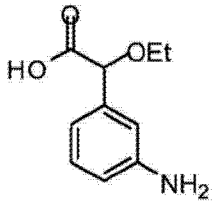
[0132]



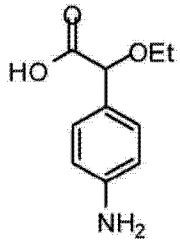
，



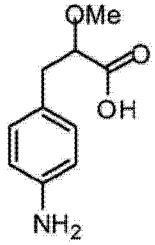
，



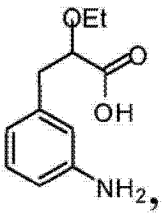
，



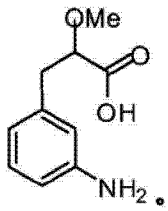
，



，



，和

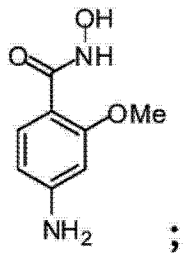


。

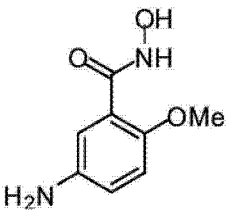
[0133] 在一些实施方案中，被考虑的化合物包括：4- 氨基 -N- 羟基 -2- 甲氧基苯甲酰胺（化合物 13）；6- 甲氧基喹啉 -5- 羧酸（化合物 36）；6- 甲氧基 -1,2,3,4- 四氢喹啉 -5- 羧酸（化合物 37）；和 5- 二异丙基氨基水杨酸（化合物 38）。

[0134] 其他示例性化合物包括以下所示的那些：

[0135] （化合物 13）：

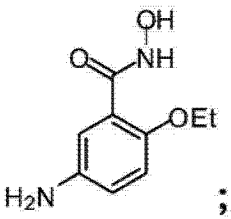


；（化合物 14）：

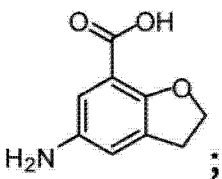


；

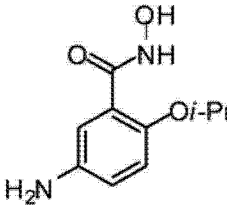
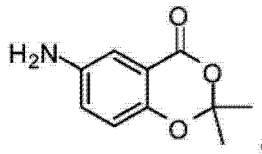
[0136] （化合物 26）：



；（化合物 17）：



；

[0137] （化合物 31）：；（化合物 28）：。

[0138] 本发明中所考虑的化合物包括化合物的外消旋混合物及对映异构体，例如：(±)-2- 羟基 -3-(3'- 氨基苯基）丙酸（化合物 20）；(±)-2- 甲氧基 -2-(4'- 氨基苯基）乙酸（化合物 23）；(±)-2- 乙氧基 -2-(3'- 氨基苯基）乙酸（化合物 32）；(±)-2- 乙氧基 -2-(4'- 氨基苯基）乙酸（化合物 33）；(±)-2- 甲氧基 -3-(4'- 氨基苯基）丙酸（化合物 34）“±34”（外消旋形式）；(±)-2- 乙氧基 -3-(4'- 氨基苯基）丙酸（化合物 39）；(±)-2- 乙氧基 -3-(3'- 氨基苯基）丙酸（化合物 40）。

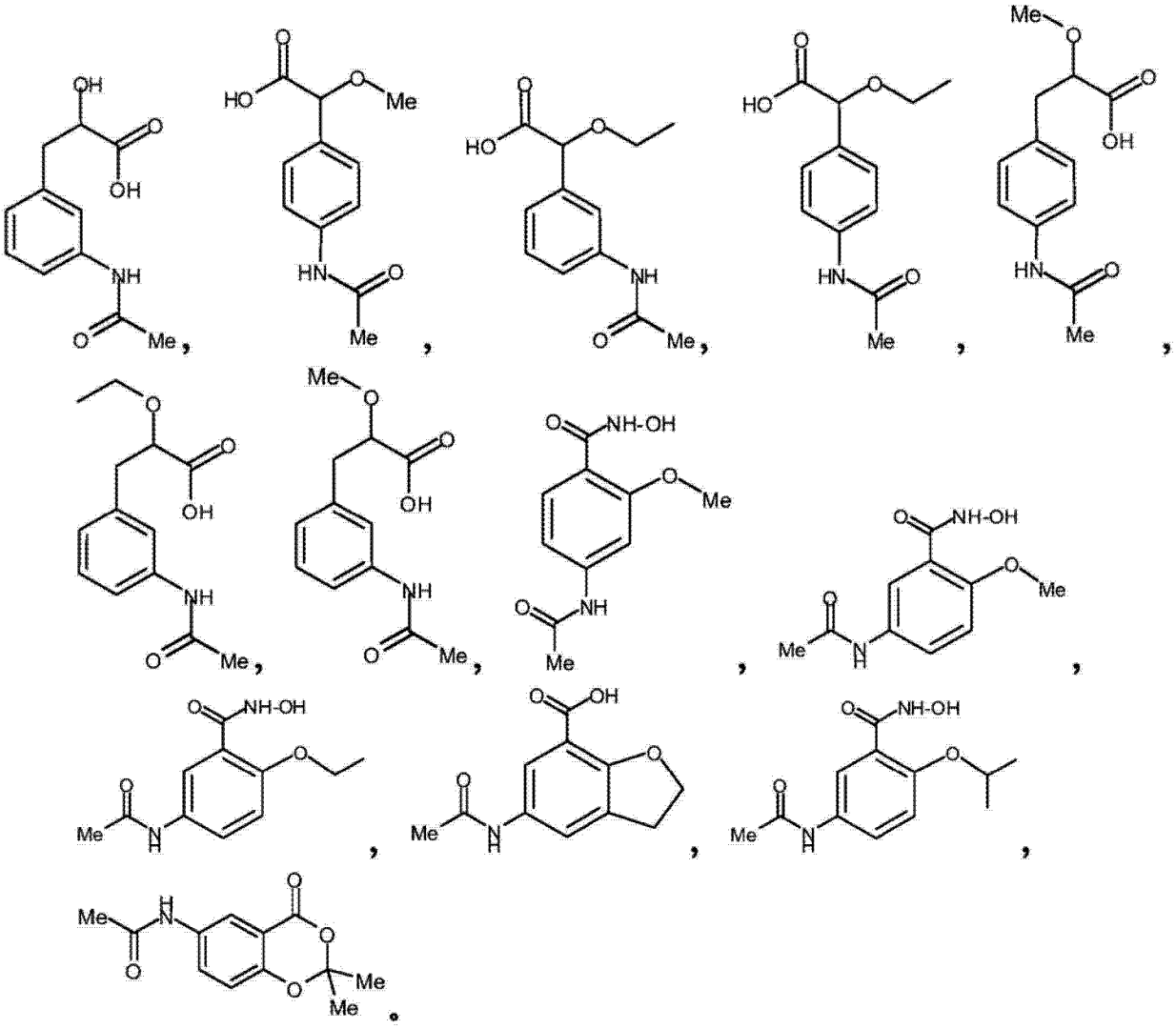
[0139] 例如在本发明公开的方法中使用的化合物可以为以下外消旋混合物的对映异构体：(R,S)-2- 羟基 -2-(3- 氨基苯基）乙酸（化合物 10）；(R,S)-2- 羟基 -2-(4- 氨基苯基）乙酸（化合物 11）；(R,S)-2- 羟基 -3-(4'- 氨基苯基）丙酸（化合物 21）；(R,S)-2- 甲氧基 -2-(3'- 氨基苯基）乙酸（化合物 22）；(R,S)-2- 甲氧基 -3-(3'- 氨基苯基）丙酸（化合物 35）；(R,S)-2- 甲氧基 -3-(4- 氨基苯基）丙酸（化合物 34）以及对映异构体，例如：(+)2-S- 甲氧基 -3-(4- 氨基苯基）丙酸；(-)2-R- 甲氧基 -3-(4- 氨基苯基）丙酸。在一些实施方案中，(R,S)-2- 羟基 -3-(4'- 氨基苯基）丙酸（化合物 21）或（±)-2- 羟基 -3-(3'- 氨基苯基）丙酸（化合物 20）是优选的。

[0140] 所考虑的化合物的其他外消旋类型的混合物包括例如：(±)-2- 羟基 -2-(3'- 氨基苯基）乙酸（化合物 10）；(±)-2- 羟基 -2-(4'- 氨基苯基）乙酸（化合物 11）；(±)-2- 羟基 -3-(4'- 氨基苯基）丙酸（化合物 21）和（±)-2- 甲氧基 -2-(3'- 氨基苯基）乙酸（化合物 22）。

[0141] 被考虑用于本发明公开的方法中的其他化合物：5- 氨基水杨基 - 氧肟酸（化合物 5）；3- 二甲基氨基水杨酸（化合物 6）；2- 甲氧基 -4- 氨基苯甲酸（化合物 7）；2- 甲氧基 -5- 氨基苯甲酸（化合物 8）；5- 甲基氨基水杨酸（化合物 9）；4- 甲基氨基水杨酸（化合物 12）；4- 乙酰基氨基水杨酸（化合物 16）；2- 乙氧基 -4- 氨基苯甲酸（化合物 18）；2- 乙氧基 -5- 氨基苯甲酸（化合物 19）；4- 二甲基氨基水杨酸（化合物 24）；2- 乙氧基 -4- 氨基苯甲酰基氧肟酸（化合物 25）；6- 羟基喹啉 -5- 羧酸（化合物 27）；2-(2- 丙基）氧基 -4- 氨基苯甲酸（化合物 30）；4-(1- 哌嗪基）水杨酸（化合物 41）；(R,S)5- 氧杂 - 喹啉 -6- 羧酸（化合物 15）；6- 甲氧基喹啉 -5- 羧酸（化合物 36）；6- 甲氧基 -1,2,3,4- 四氢喹啉 -5- 羧酸（化合物 37）；5- 二异丙基氨基水杨酸（化合物 38）；和 4- 二异丙基氨基水杨酸（化合物 42）。

[0142] 所考虑的化合物、以及包含至少一种化合物的药物组合物可以选自：N- 乙酰基 -(R)-(-)-3-(4- 氨基苯基）-2- 甲氧基丙酸、N- 乙酰基 -(S)-(-)-3-(4- 氨基苯基）-2- 甲氧基丙酸；以及外消旋 N- 乙酰基 -(S)-(-)-3-(4- 氨基苯基）-2- 甲氧基丙酸、或选自以下的化合物，或者其药学可接受的盐或 N- 氧化物：

[0143]



[0144] 其他所考虑的化合物包括化合物 20、化合物 21、4- 乙酰氨基 -N- 羟基 -2- 甲氧基苯甲酰胺 ;1- 乙酰基 -6- 甲氧基 -1,2,3,4- 四氢喹啉 -5- 羧酸、5- 乙酰氨基 -2 羟基苯甲酸（例如乙酰化的 5- 氨基水杨酸），或者其药学可接受的盐或 N- 氧化物。

[0145] 此外，包含由所描绘的式所表示的化合物以及例如药学可接受的载体的组合物在此被考虑用于本发明公开的方法中。

[0146] 用于制备所考虑的化合物的方法可以在例如 WO2007/010516 和 WO2007/010514 中找到，这些文献在此以引用方式全文并入本文。

[0147] 方法

[0148] 用于预防或治疗纤维化（例如肝纤维化和 / 或肠纤维化）的方法构成了本发明公开的一部分。此类方法可以包括向有需要的患者或处于风险中的患者施用包含 PPAR γ 试剂的药学制备物，所述 PPAR γ 试剂例如本发明公开的化合物，例如式 I、IIa 或 IIb，例如化合物 17、29、34 或 39。例如提供了用于预防或治疗肝纤维化的方法，该方法包括向有需要的患者施用本发明公开的化合物。备选地，提供了预防或治疗肠纤维化的方法，该方法包括向有需要的患者施用本发明公开的额化合物。

[0149] 使用上述方法治疗的患者可以具有或不具有可检测的纤维化。在一些实施方案中，在对患者施用所公开的化合物（例如化合物 17、29、34 或 39）后，例如在 1 天、2 天、1

周、1 个月、6 个月或更长后，患者中存在的纤维化的量减少至少大约 5％、10％、20％、30％、40％或者甚至 50％。施用此类化合物可以在例如至少以每日为基础。所述的化合物可以口服施用。与未施用化合物（例如本发明公开的化合物）的患者相比，作为施用本发明公开的化合物的结果，患者纤维化的临床表现可以延迟至少例如 6 个月、1 年、18 个月、甚至 2 年或更长。

[0150] 有需要的患者可以患有已经发展成肝硬化的肝纤维化。处于肝纤维化风险下的患者可以包括患有乙型肝炎、丙型肝炎或非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的那些患者。在非酒精性脂肪肝疾病（包括脂肪变性和肝硬化）的范围中包括 NASH。NASH 是代谢综合征的一部分，其特征在于肥胖症、2 型糖尿病和血脂障碍，并且最终可以导致肝细 胞癌。

[0151] 此外，还提供了治疗与肝纤维化有关的紊乱的方法，例如治疗以下中的至少一种：某些贮积症和先天性代谢缺陷，例如 α 1- 抗胰蛋白酶缺陷、铜贮积症（例如 Wilson 病）、果糖血症、半乳糖血症、糖原贮积症（例如 III、IV、VI、IX 和 X 型）、铁过量综合症（例如血色沉着病）、脂质异常（例如 Gaucher 病）、过氧化物酶紊乱（例如 Zellweger 综合症）和酪氨酸血症；细菌感染（例如布鲁氏菌病）；寄生虫感染（例如包虫病）；NASH；病毒感染（例如乙型肝炎或丙型肝炎，包括慢性乙型肝炎或丙型肝炎）；Budd-Chiari 综合症；心力衰竭；肝静脉闭塞疾病；和门静脉血栓形成。此外，还考虑了治疗先天性肝纤维化的方法。所述的组合物可以口服施用。

[0152] 已经将药品和 / 或酒精的滥用与肝纤维化相联系。本发明考虑了治疗具有药品和 / 或酒精滥用史的患者中的肝纤维化的方法。例如具有以下中的至少一种的滥用史的患者：酒精、胺碘酮、氯丙嗪、异烟肼、甲氨蝶呤、甲基多巴、酚丁和甲苯磺丁脲。

[0153] 处于肠纤维化的患者可以包括患有溃疡性结肠炎、炎性肠病或克罗恩病的那些患者。此外，处于风险下的患者还可以包括患有被诊断为克罗恩病或结肠炎早期、广泛的和 / 或严重的结肠疾病的那些患者，存在原发性硬化性胆管炎的患者，和 / 或患有癌症家族史的患者。

[0154] 此外，还提供了治疗与肠纤维化有关的紊乱的方法，例如治疗以下中的至少一种：溃疡性结肠炎、炎性肠病或克罗恩病。

[0155] 在此考虑了预防或治疗肾纤维化、心纤维化、心内膜心肌纤维化、特发性肺纤维化、髓纤维化、腹膜后纤维化和 / 或肾源性系统纤维化的方法，该方法包括向有需要的患者施用包含 PPARγ 试剂（例如本发明公开的化合物）的药学制备物。

[0156] 本发明的化合物可以单独使用，或者彼此结合使用，在结合使用的情况下，本发明的至少两种化合物一起用于单一的组合物中，或者作为治疗方案的一部分。此外，本发明的化合物还可以与用于治疗药品和 / 或酒精滥用、肾纤维化、心纤维化、心内膜心肌纤维化、特发性 肺纤维化、髓纤维化、腹膜后纤维化、或肾源性系统纤维化、药品和 / 或酒精滥用的其他药品结合使用。

[0157] 通常，活性成分的治疗有效量将为大约 0.1mg/kg 至大约 100mg/kg，可选的是大约 1mg/kg 至大约 100mg/kg，可选的是大约 1mg/kg 至大约 10mg/kg。施用量取决于多个变量，例如待治疗的疾病或适应症的类型和程度，具体患者的整体健康状态，被传递的结合蛋白质的相对生物学效力、结合蛋白质的配制物、配制物中赋形剂的存在和类型以及施用途径。施用的初始剂量可以增加至更高水平以上，以便快速地达到所需的血液水平或组织水

平，或者初始剂量可以低于最佳值，并且每日剂量可以根据具体情况在治疗过程中逐渐增加。人类的剂量可以在例如常规的第一阶段剂量升级研究中优化，其中所述的研究被设计由 0.5mg/kg 至 20mg/kg 之间运行。定量施用的频率可以根据多种因素而改变，例如施用途径、剂量的数量和待治疗的疾病状况。示例性的定量施用频率为每日一次、每周一次和每两周一次。

[0158] 所考虑的配制物或组合物包含本发明公开的化合物，并且通常包含药学可接受的载体。

[0159] 在此考虑的组合物可以根据它们的预期用途以多种方式施用，这是本领域公知的。例如如果本发明的组合物以口服方式施用，则它们可以被配制为片剂、胶囊、颗粒、粉末或糖浆。备选地，本发明的配制物可以以注射（静脉内、肌肉内或皮下）、滴注制备物或栓剂的形式进行肠胃外施用。对于眼部粘膜途径的应用而言，本发明的组合物可以被配制为眼药水或眼膏。可以通过常规手段制备这些配制物，并且如果需要，所述的组合物可以与任何传统的添加剂混合，例如赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂、溶解剂、悬浮助剂、乳化剂或包衣剂。

[0160] 在题述发明的配制物中，润湿剂、乳化剂和润滑剂（例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁），以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、风味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂可以存在于配制的试剂中。

[0161] 题述组合物可以适用于口服、鼻腔、局部（包括口腔和舌下）、直肠、阴道、气溶胶和 / 或肠胃外施用。所述的配制物可以方便地存在于单位剂型中，并且可以通过制药领域中公知的任何方法来制备。可以与载体材料结合从而产生单次剂量的组合物的量会根据待治疗的受试对象和施用的具体模式而改变。

[0162] 制备这些配制物的方法包括将本发明的组合物与载体、以及任选的一种或多种辅助组分相联合的步骤。通常，所述的配制物是通过将试剂与液体载体或细分的固体载体或两者均匀且紧密地联合，然后如果需要使所得的产物成型而制备的。

[0163] 适用于口服施用的配制物可以为胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂（采用风味基物质，通常为蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶）、粉末、颗粒的形式，或者为水性或非水性液体的溶液或悬浮液，或者为水包油或油包水液体乳剂，或者为酏剂或糖浆，或者为软锭剂（采用惰性基物质，例如凝胶和甘油、或者蔗糖和阿拉伯树胶），这些物质均包含预定量的题述组合物作为活性组分。此外，本发明的组合物还可以以大药丸、干药糖剂或糊剂的形式施用。

[0164] 在用于口服施用的固体剂型（胶囊、片剂、丸剂、薄膜包衣的片剂、糖包衣的片剂、粉末、颗粒等）中，题述组合物与一种或多种药学可接受的载体混合，例如柠檬酸钠或磷酸二钙和 / 或以下中的任意 ：(1) 填料或填充剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和 / 或硅酸 ；(2) 粘合剂，例如羧甲基纤维素、藻酸盐、凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯树胶 ；(3) 保湿剂，例如甘油 ；(4) 崩解剂，例如琼脂 - 琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠 ；(5) 溶液阻滞剂，例如石蜡 ；(6) 吸收促进剂，例如季铵化合物 ；(7) 潮湿剂，例如乙醇和单硬脂酸甘油酯 ；(8) 吸收剂，例如高岭土和膨润土 ；(9) 润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠和它们的混合物 ；以及 (10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，所述的组合物还可以包含缓冲剂。相似类型的固体组合物还可以作为软填充的和硬填充的凝胶胶囊中的填料使用，其中所述的胶囊使用了诸如

乳糖或牛奶糖、以及高分子量聚乙二醇等之类的赋形剂。

[0165] 配制物和组合物可以包含本发明公开的化合物的微粒化的晶体。可以对单独的化合物的晶体，或者对晶体的混合物、以及药物赋形剂或载体的一部分或全部进行微粒化。本发明化合物的微粒化晶体的平均粒径可以为例如大约 5 至大约 200 微米、或者为大约 10 至大约 110 微米。

[0166] 片剂可以通过可任选地与一种或多种辅助组分一起进行压制或成型而制得。可以使用粘合剂（例如明胶或羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（例如羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠）、表面活性剂或分散剂来制备压制的片剂。可以通过将使用惰性液体稀释剂弄湿的题述组合物的混合物在合适的机器中模制成型来制备成型的片剂。可任选地，可以对片剂和其他固体剂型（例如薄膜包衣的片剂或糖包衣的片剂、胶囊、丸剂和颗粒）进行评分，或使用包衣和壳（例如药物配制领域中公知的肠包衣和其他包衣）来制备所述的片剂和其他固体剂型。

[0167] 用于口服施用的液体剂型包括药学可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了题述组合物以外，液体剂型可以包含本领域中常用的惰性稀释剂，例如水或其他溶剂，溶解剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸酯、乙酸乙酯、苄基醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3- 丁二醇、油（具体为棉花籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢呋喃基甲醇、聚乙二醇、山梨聚糖的脂肪酸酯、环糊精及它们的混合物。

[0168] 除了题述组合物以外，悬浮液可以包含悬浮剂，例如乙氧基化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨聚糖酯、微晶纤维素、偏铝酸、膨润土、琼脂 - 琼脂、黄芪胶和它们的混合物。

[0169] 用于直肠或阴道施用的配制物可以以栓剂的形式存在，栓剂可以通过将题述组合物与一种或多种合适的无刺激赋形剂或载体（例如包括可可油、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯，并且它们在室温下为固体，但是在体温下为液体，因此在体腔中溶化并释放活性试剂）混合来制备。此外，适用于阴道施用的配制物还包括阴道栓剂、棉塞、乳剂、 凝胶、糊剂、泡沫或喷雾配制物，其包含本领域已知为合适的这些载体。

[0170] 用于题述组合物的经皮或局部施用的剂型包括粉末、喷雾剂、药膏、糊剂、乳剂、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。活性成分可以在无菌条件下与药学可接受的载体，以及与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0171] 除了题述组合物以外，药膏、糊剂、乳剂和凝胶可以包含赋形剂，例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石、氧化锌或它们的混合物。

[0172] 除了题述组合物以外，粉末和喷雾剂可以包含赋形剂，例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙、聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷雾剂可以额外地包含常规的推进剂，例如氟氯烃和挥发性的未取代的烃，例如丁烷和丙烷。

[0173] 本发明的组合物和化合物可以备选地通过气溶胶施用。这是通过制备包含所述的化合物的液体气溶胶、脂质体制备物或固体粒子而完成的。可以使用非液体（例如碳氟化合物推进剂）悬浮液。由于声波喷雾器将试剂暴露于剪切的情况降至最低，所以可以使用声波喷雾器，其中所述的剪切可以导致题述组合物中所包含的化合物被降解。

[0174] 通常，液体气溶胶是通过将题述组合物的水性溶液或悬浮液与常规的药学可接受

的载体和稳定剂一起配制而制得的。载体和稳定剂根据特定题述组合物的需要而改变，但是通常包括非离子表面活性剂（Tween、Pluronic 或聚乙二醇）、无害的蛋白质（例如血清白蛋白）、山梨聚糖酯、油酸、卵磷脂、氨基酸（例如甘氨酸）、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气溶胶通常由等渗溶液制备。

[0175] 适用于肠胃外施用的本发明的药物组合物包含题述组合物，以及一种或多种药学可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散剂、悬浮液、乳液或无菌粉末，这些物质可以在将要使用之前被重新构建成无菌的可注射溶液或分散剂，其中所述的溶液或分散剂可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、溶质，该溶质使所述的配制物与预期接受者的 血液或者悬浮试剂或增稠试剂是等渗的。

[0176] 在本发明的药物组合物中可以使用的合适的水性和非水性载体的实例包括水，乙醇，多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等），和它们的合适的混合物；植物油（例如橄榄油）；和可注射的有机酯，例如油酸乙酯和环糊精。可以通过例如使用包衣材料（例如卵磷脂）、在分散剂的情况下通过保持所需的粒径、及通过使用表面活性剂而保持合适的流动性。题述组合物的治疗效力可以通过本领域的那些技术人员已知的多种方式来测定。

[0177] 在整个说明书中，其中组合物被描述为具有、包括或包含特定的成分，这应该理解为组合物也基本上由或者由所述的成分构成。相似地，其中方法被描述为具有、包括或包含特定的加工步骤，该方法也基本上由或由所述的加工步骤构成。除非另作说明，步骤的顺序或用于实施某些作用的顺序是不重要的，只要本发明保持可操作即可。此外，除非另作说明，两个或多个步骤或作用可以同时进行。

实施例

[0178] 通过以下实施例进一步说明本发明公开的内容。提供以下实施例仅为了达到说明的目的，并且不应该被解释为以任何方式限定本发明公开的范围或内容。

[0179] 实施例 1：肝脏纤维化的研究

[0180] 通过注射四氯化碳（CCl_4）在雄性 C57b16 小鼠（Charles River，l'Arbresle，France）中诱导肝脏纤维化。C57b16 小鼠称重为 22-25g 并在实验室条件下饲养 1 周然后进行试验。每个笼子容纳 5 只动物，并随意获得食物和水。

[0181] 本研究由 5 个试验组构成（参见表 1）：对照填喂法（CG）、对照腹膜内引入（CIP）、四氯化碳（CCl_4）、化合物 34 和 JWH-133 试剂（参见 Julien et al.，(2005)Gastroenterology128:742-755(JWH-133 为 CB2 特异性激动剂和抗纤维生成试剂））。

[0182] 表 1

[0183]

试验组	处理	服药时间表
对照口服填喂法（5只小鼠）	羧甲基纤维素溶液（口服填喂法的媒介物）和橄榄油（CCl_4的媒介物）	每日，>5周
对照腹膜内引入（5只小鼠）	DMSO/Tween（JWH-133 媒介物）和橄榄油（CCl_4的媒介物）	每日，>5周
四氯化碳（10只小鼠）	CCl_4于橄榄油中，通过腹膜内施用（200 uL）	每周3次（每2天1次），>5周
化合物34(10只小鼠)	通过口服填喂法施用化合物34在0.5% CMC中形成的30 mM溶液（200 uL），并通过腹膜内施用处于橄榄油中的CCl_4（200 uL）	34：每日，>5周；CCl_4：每周3次，>5周
JWH-133试剂（10只小鼠）	通过腹膜内施用3 mg/kg处于DMSO/Tween中的JWH-133(100 uL)，并通过腹膜内施用处于橄榄油中的CCl_4（200 uL）	JWH：每日，>5周；CCl_4：每周3次，>5周

[0184] 与JWH-133(抗纤维生成试剂)相比,评价化合物34(PPARg的特异性配基)的有效性。口服施用化合物34并注射CCl_4,持续大约5周。每日服药200uL的化合物34(30mM溶液)。每日通过腹膜内注射以3mg/kg施用JWH-133(剂量体积＝100uL)。通过在5周内慢性暴露于剂量增加的CCl_4来诱导肝脏纤维化模型。第1周,小鼠接受腹膜内注射CCl_4(再次悬浮于橄榄油中),每周2次,剂量为80μl/kg小鼠体重。第2周,3次注射CCl_4,每2天1次,剂量为160μl/kg。第3周,3次注射CCl_4,每2天1次,剂量为240μl/kg。第4周,3次注射CCl_4,每2天1次,剂量为320μl/kg。在第5周,在末次施用CCl_4后的第3天,对小鼠实施安乐死。

[0185] 在试验过程中记录体重。如图1所示,在不同组别的小鼠之间,体重的演变中无可察觉的差异。

[0186] 切除肝脏,将等分物快速冷冻于液氮中,并保持在-80℃下直至进行分析为止。将各肝脏部分的一部分固定于10％福尔马林中以用于组织学。

[0187] 实施例2:肝脏纤维化研究的组织学分析

[0188] 对福尔马林固定的肝脏组织进行加工,并使用苏木精和伊红(H&E)以及天狼猩红染料(在组织切片中对胶原蛋白特异性地着色)对5μm厚的石蜡切片进行染色,从而评价肝脏中纤维化的程度。由3名不同的试验者盲态地分析各切片,采用Metavir评分对肝脏的各叶片(5)的纤维化程度进行定量(参见图2A的Metavir评分表)。使用20x物镜获得图2B中的照片。对照组具有F0分,CCl_4组具有F3分,表明肝脏纤维化。化合物34(GED)显示纤维化降低的程度比JWH-133组更大,其中化合物34的评分为F1,而JWH-133的评分为F2。

[0189] 如同预期,在2组对照小鼠(对照填喂法(CG)和对照IP(CIP))中未观察到纤维化。在仅接受媒介物的纤维化小鼠组(CCl_4组)中,观察到平均评分为2.5±0.5,根据Metavir评分相当于中度至重度的纤维化(参见图3A)。对于接受JWH-133或化合物34(GED)的纤维化小鼠而言,分别观察到评分为2±0和2.1±0.2。对于JWH-133和GED而

言，观察到纤维化的程度由重度纤维化降低至中度纤维化，并且效力相似。

[0190] 采用改编的 Metavir 评分来证明这些结果（图 3B）：由 2 名研究者盲态分析各肝脏切片，根据 METAVIR 评分在低倍放大 (X5) 下对分类为 F0 至 F4 的 >30 个汇管 (portal tract) 进行定量 ((1 切片）评分＝ Σ(PTF1+PTF2+PTF3+PTF4))。采用该评分证明与未经治疗的动物的纤维化评分相比，JWH 和 GED 分别降低 14.2％和 12.5％，并且 2 种试验分子的治疗效果似乎相似。

[0191] 实施例 3：肝脏纤维化研究的基因表达分析

[0192] 通过定量实时 PCR，根据细胞因子 (IL-1β，TNF-α）的基因表达水平以及与纤维化的机制有关的基因的水平来评价施用化合物 34(GED) 和特异性 CB2 激动剂 (JWH-133) 的作用。

[0193] 使用 Rneasy 试剂盒 (Macherey Nagel,Hoerdt,France)，根据制造商提供的说明书由肝脏分离总 RNA。使用分光光度法进行 RNA 定量。在使用 20-50 单位的不含 RNase 的 Dnase I(Roche Diagnostics Corporation,Indianapolis,IN,USA) 在 37 ℃下处理 30min 之后，寡 -dT 引物 (Roche Diagnostics Corporation,Indianapolis,USA) 用于合成单链 cDNA。使用含有鼠特异性寡核苷酸（参见表 2）的 SYBR Green Master Mix(Applera,Courtaboeuf,France) 在 GeneAmp Abiprism7000(Applera,Courtaboeuf,France) 中定量 mRNA。在各试验中，包含校准的且无模板的对照。各样品以 3 个平行试验运行。使用 Abiprism7000SDS 软件 (Applera,Courtaboeuf,France) 分析 SYBR 绿染料的强度。所有结果相对于未受影响的管家基因 β- 肌动蛋白归一化。

[0194] 表 2

[0195]

鼠基因	引物序列 (5’→3’)
β-肌动蛋白	F:5’-gggTCAgAAggATTCCTATg-3’（SEQ ID NO: 1） R: 5’-ggTCTCAAACATgATCTggg-3’（SEQ ID NO: 2）
TNF-α	F:5’-TgggAgTAgACAAggTACAACCC-3’（SEQ ID NO: 3） R:5’-CATCTTTCTCAAAATTCgAgTgACAA-3’（SEQ ID NO: 4）
IL-1β	F:5’-gATCCACACTCTCCAgCTgCA-3’（SEQ ID NO: 5） R:5’-CAACCAACAAgTgATATTCTCCATg-3’（SEQ ID NO: 6）
胶原蛋白-1	F: 5’- GAG TAC TGG ATC GAC CCT AAC CAA-3’（SEQ ID NO: 7） R: 5’-ACA CAG GTC TGA CCT GTC TCC AT-3’（SEQ ID NO: 8）
α-SMA	F: 5’- CCT GAC GGG CAG GTG ATC-3’（SEQ ID NO: 9） R: 5’- ATG AAA GAT GGC TGG AAG AGA GTC T-3’（SEQ ID NO: 10）

[0196] 在不同组的小鼠中，细胞因子的基因表达无显著的改变。对于与纤维化的机制有关的基因而言，与对照动物 (CG 和 CIP 组）相比，在患有纤维化的动物 (CCl_4 组）中观察到 α-SMA 和胶原蛋白 -1 的表达增加。如图 4 和表 3 所示，与 CCl_4 组（纤维化对照）相比，在 GED 和 JWH-133 组小鼠中 α-SMA 和胶原蛋白 -1 的水平降低。就胶原蛋白 -1 的水平而言，与 CCl_4 小鼠相比，通过化合物 34 治疗的小鼠组显著降低，这两组小鼠的胶原蛋白 -1 的值分别为 42.81±14.81，p ＝ 0.03 与 75.15±5.23。这些生物学数据以及在使用化合物 34 治疗的小鼠中所观察到的组织学改善表明化合物 34 可以具有治疗性的抗纤维化性质。

[0197] 表 3

[0198]

组	胶原蛋白 -1	α -SMA
CCl_4	138.12±34.68	65.51±22.24
JWH-133+CCl_4	87.59±16.97	30.07±4.7
化合物 34+CCl_4	75.15±5.23, p = 0.03	42.81±14.81

[0199] 实施例 4 :肝脏纤维化研究的肝脏血液酶分析

[0200] 在小鼠的血清中,根据不同的肝脏生物化学参数 :肝酶 (丙氨酸氨基转移酶 (AST) 和天冬氨酸氨基转移酶 (ALT)) 、γGT 和碱性磷酸酶,来评价口服施用化合物 34(GED) 和特异性 CB2 激动剂 (JWH-133) 的作用。

[0201] 如同预期,在末次施用 CCl_4 后的 4 天,在任一组小鼠中未观察到 AST、ALT 和 Alk P 增多。化合物 34 与任何血液肝脏酶的增多无关,表明缺乏肝脏毒性。

[0202] 如同通过组织学和肝脏标示物所评价的那样,在患有肝脏纤维化 (通过重复注射 CCl_4 所诱导) 的小鼠中,JWH-133 和化合物 34 具有相似的抗纤维化的作用。如同预期,JWH 将肝纤维化的损伤降低 14%,并使胶原蛋白 -1mRNA 的肝脏浓度正常。化合物 34 具有相似的作用,但不具有肝脏毒性。数据表明化合物 34 可以为具有抗炎和抗纤维化性质的第一化合物。

[0203] 实施例 5 :肠纤维化的研究

[0204] 本实施例描述了用于评价化合物 34 对肠纤维化的作用的实验。在 C57b16 小鼠中诱导慢性结肠炎,其方法为 5 天内给与溶解于无菌饮用水中的 2.5% DSS(40,000-50,000MW,TdB consultancy AB,Sweden),其后 7 天给与常规饮用水,进行 3 个周期。

[0205] 本研究由 3 个试验组组成 (参见表 4) :对照组、DSS 对照组、GED(化合物 34) 组。

[0206] 表 4

[0207]

试验组	治疗	服药时间表
对照 (10 只小鼠)	H_2O	每日, 共 36 天
DSS 对照 (25 只小鼠)	溶解于饮用 H_2O 中的 2.5% DSS	5 天服用, 7 天停止, 共 36 天
化合物 34(25 只小鼠)	通过口服填喂法施用化合物 34 在 0.5% CMC 中形成的 30 mM 溶液 (200 uL), 以及溶解于饮用 H_2O 中的 2.5% DSS	化合物 34: 每日, 13-36 天; DSS: 5 天服用, 7 天停止, 共 36 天

[0208] 以最佳剂量 (30mM) 使用化合物 34,并在第二周期 DSS 后每日通过口服填喂法施用该化合物,直到实施安乐死为止。通过监测体重,每周 2 次检查接受 DSS 的小鼠的结肠炎的发展情况。在第三个周期 DSS 后的一周实施小鼠的安乐死 (参加图 5)。死后评价结肠的尺寸和重量。

[0209] 实施例 6 :肠纤维化研究的分析

[0210] A. 结肠的重量 / 尺寸比

[0211] 肠纤维化的特征在于结肠及附属物 (adherence) 的缩短和增厚。结肠的重量 / 尺

寸比的量度为炎症和纤维化的水平的指示剂。如图 6A 所示，与仅接受常规水的对照小鼠相比，在接受媒介物的 DSS 小鼠中观察到结肠的重量 / 尺寸比显著增大 124%，它们的比值分别为 44.98±6.31(DSS 小鼠）与 20.11±3.91（对照小鼠），$p<0.05$。这些结果通过 DSS 小鼠中结肠的显著缩短来显示（图 6B)。化合物 34 使得 DSS 的促纤维化作用降低 34%，从而导致与接受媒介物的 DSS 小鼠相比，结肠的重量 / 尺寸比显著降低，它们的比值分别为 38.13±7.82（接受化合物 34 的小鼠）与 44.98±6.31（接受媒介物的 DSS 小鼠）($p<0.05$)（图 6A)。因此，所述的化合物减轻了纤维化的形态学迹象（例如结肠的缩短和增厚），并降低了胶原蛋白在结肠中的沉积（图 6B)。

[0212] B. 通过组织学评估的炎症水平

[0213] 取样结肠横向部分的环（死后），并固定于 4%福尔马林中，再包埋于石蜡中用于组织学分析。使用 May-Grunwald-Giemsa 对切片 (4μm) 进行染色并由 2 名研究者盲态进行多参数组织学评分 (0 至 18)。该染色允许对炎症进行定量。组织学分级（反映了炎症的水平）是根据粘膜中细胞浸润的强度、其在粘膜下层的扩张以及上皮损伤的存在情况来分配的（参见表 5)。

[0214] 表 5

[0215]

划分	级别	描述
严重情况	0	无
	1	轻微
	22	中度
	3	重度
扩张情况	0	无
	1	粘膜
	2	粘膜及粘膜下层
	3	透壁
再生情况	4	无组织修复
	3	表面上皮不完整
	2	耗尽隐窝的再生
	1	几乎完全再生
	0	完全再生或正常组织
隐窝损伤情况	0	无
	1	基底的 1/3 被损伤
	2	基底的 2/3 被损伤
	3	仅表面上皮是完整的
	4	全部的隐窝和上皮丧失
百分比	1	1-25%
	2	26-50%
	3	51-75%
	4	76-100%

[0216] 使用传统的 MGG 染色，针对各个小鼠结肠在组织性水平下评价炎症的状态。如同预期，与接受常规水的对照小鼠相比，在接受 DSS 的小鼠组中观察到明显的且强烈的炎症，它们的值分别为 3.77±0.80（接受 DSS 的小鼠）与 0.50±0.33（接受常规水的小鼠），$p<0.05$（参见图 7）。该结果证明 3 个周期的 DSS 诱导了炎症。与仅接受媒介物的 DSS 小鼠相比，在接受化合物 34 的 DSS 小鼠中观察到炎症水平显著降低，它们分别为 2.18±0.48（接受化合物的 DSS 小鼠）与 3.77±0.80（接受媒介物的 DSS 小鼠），$p<0.05$。

[0217] C. 纤维化的水平

[0218] C1. 通过天狼猩红染色的评价

[0219] 将获得的结肠样品迅速在 PBS 中的 10％缓冲的福尔马林 (pH7.4) 中固定 3h，在梯度乙醇中脱水并包埋在低温融合的石蜡中。对福尔马林固定的结肠组织进行加工，并使用天狼猩红染料染色 5μm 厚的石蜡切片以用于组织学分析。使用 x20 倍的物镜获得图片。由 3 名不同的试验者盲态分析各切片，从而使用 0 至 4 的评分对纤维化的程度进行定量。

[0220] 与对照小鼠相比，在 DSS 小鼠的结肠中观察到纤维化的水平显著升高，它们的值分别为 2.27±0.12(DSS 小鼠）与 1.12±0.07（对照小鼠）（参见图 8）。该结果证明通过 3 个周期的 DSS 诱导的慢性炎症会诱导肠纤维化。此外，还证明与仅接受媒介物的 DSS 小鼠相比，对 DSS 小鼠施用化合物 34 会降低纤维化的水平 (1.625±0.15 与 2.27±0.12，$p<0.05$)。

[0221] C2. 通过马松三色染料进行的评价

[0222] 马松三色和胶原蛋白染料用于评价结肠纤维化的水平。将获得的结肠样品迅速在处于 PBS 中的 10％缓冲的福尔马林 (pH7.4) 中固定 3h，在梯度乙醇中脱水并包埋在低温融合的石蜡中。将连续的 3μm 切片在甲醇和 3％过氧化氢溶液中温育 40min，然后在 PBS 中漂洗。根据马松三色阳性的结缔组织染色的强度和程度及组织结构破坏的情况，将肠纤维化评分为无、轻微或严重。

[0223] C3. 胶原蛋白水平的评价

[0224] 就免疫组织化学分析而言，将由接触得到的组织样本在室温下在新鲜的 4％多聚甲醛 (PFA)/PBS 溶液中固定 3h，在梯度乙醇系列中脱水并包埋在低温融合的石蜡中。将 3μm 厚的切片在甲醇中温育 40min，然后在 3％过氧化氢中温育 5min。将样品与针对如下的特异性抗体：I-III 型胶原蛋白 (Abcam)、结缔组织生长因子 (CTGF)(Abcam)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、SMAD2/3（它们为纤维化的主要标志物）温育过夜。使用 PBS 将样品洗涤 5min，并与链 霉亲和素－生物素－过氧化物酶缀合的二抗 (Dako LSAB Corporation，cod K0675，Dako-Cytomation，Milano) 温育。在 PBS 中洗涤 10min 后，将切片与 3，3－二氨基联苯胺－四氢氯化物温育 1-3min。

[0225] 省略一级抗体，表现免疫反应的特异性。最后使用 Mayer 的苏木精对样品进行染色并在 Olympus BX51Light Microscope(Olympus，Optical Co.Ltd.，Tokyo，Japan) 下观察。

[0226] 在对由 DSS 和对照小鼠得到的结肠中的胶原蛋白 I-VII 进行免疫组织化学分析 (x20) 中，胶原蛋白 I-VII 在 DSS 小鼠的大肠中的染色主要位于粘膜下层和固有肌层的结缔组织中，其中观察到胶原蛋白的强染色（参见图 9）。如图 9 所示，施用化合物 34 与胶原蛋白染色的降低有关，表明所述的化合物改善了纤维化并降低了肠纤维化的发展。

[0227] 除了抗炎作用以外，施用化合物 34 会快速地减少导致纤维化的分子事件，并预防

小鼠中由DSS诱导的肠纤维化损伤。

[0228] 就Western印迹分析而言，将0.5cm冷冻的结肠样品在RIPA缓冲剂中匀质化，其中所述的RIPA缓冲剂包含50mM Tris HCl pH7.6、150mM NaCl、1.5mM $MgCl_2$、5mM EDTA，1％Triton-X和10％甘油，其中补充有100mM氟化钠(NaF)、2mM原钒酸钠(Na_3VO_4)、10mM焦磷酸钠(NaPPi)、1mM苯基甲基磺酰氟(PMSF)和传统的蛋白酶抑制剂混合物(包含10μg/mL亮肽酶素和抑肽酶)。

[0229] 对各样品，通过PAGE分离30μg蛋白质，并进行电印迹。将硝酸纤维素膜(100％纯)与针对CTGF、胶原蛋白-I和GAPDH的一级抗体(购自Abcam,Cambridge,UK；在RT下以1:1000进行2h)温育(根据各抗体的特异方案)，其中所述的一级抗体稀释于0.1％TBS-t中的5％脱脂牛奶中。随后将膜在TBS-t0.1％中洗涤，并与二级辣根过氧化物酶缀合的抗体(抗兔和抗小鼠；Sigma Aldrich；在RT下以1:20000进行1h)温育，其中所述的二级抗体稀释于0.1％TBS-t中的5％脱脂牛奶中。最后，使用SuperSignal West Pico化学发光底物(Thermo Scientific Pierce,Erembodegem)，根据制造商提供的方案 进行免疫检测。将膜暴露于放射自显影膜(Fuji Photo Film Co.,Dusseldorf,Germany)。使用计算机辅助的密度计和ImageJ公共软件(W.S.,Rasband,ImageJ,U.S.National Institutes of Health,Bethesda,MD；http://rsb.info.nih.gov/ij/,1997－2011)测定目标条带的光密度。将组织水平表示为光密度(OD)单位/总蛋白质的数量，并根据内部对照GAPDH进行归一化，再将结果表示为对照组的百分率。

[0230] 使用IHC方法和特异性抗体，与接受媒介物的结肠炎小鼠相比，在接受GED的DSS小鼠的结肠中，观察到纤维化的主要标志物(胶原蛋白I-III、CTGF、SMAD2/3、PDGF、α-SMA和TGF-β1)减少(参见图9A-9E)。

[0231] 使用Western印迹方法证明这些结果，并在整个结肠样品中对不同纤维化的标志物进行定量(参见图10)。如表6所示，与仅接受媒介物的结肠炎小鼠相比，在使用GED处理的结肠炎小鼠中，观察到胶原蛋白I、CTGF和IL-13的表达显著减少(胶原蛋白I：90.75±19.91 与 284.4±63.86,p ＝ 0.012；CTG：55.75±17.53 与 115.1±16.88,p ＝ 0.029；IL-13：88.88±14.01 与 189.5±28.71,p ＝ 0.007)。

[0232] 表6

[0233]

	DSS	DSS+GED	p
α-SMA	125.4±19.45	97.88±15.66	0.282
胶原蛋白I	284.4±63.86	90.75±19.91	0.012
CTGF	115.1±16.88	55.75±17.53	0.029
IL-13	189.5±28.71	88.88±14.01	0.007
TGF-β1	153.6±26.25	130.5±28.02	0.5

[0234] 实施例7：肠纤维化的研究

[0235] 本实施例描述了用于评价化合物34(GED)在治疗肠纤维化中的作用的试验。

[0236] 材料与方法

[0237] 体外试验

[0238] 本研究包括总计60只野生型C57BL/6小鼠(购自Janvier(Le Genest-St-Isle,France))。所有小鼠都饲养在Lille(France)的Pasteur Institute的不含特异性病原体的设备中。根据政府指导原则N° 68/609/CEE实施动物试验。

[0239] 慢性结肠炎的诱导

[0240] 在 3 个周期 (5 天的 DSS,7 天的水) 中,通过口服施用处于饮用水中的 2.5% (w/v)DSS,在小鼠中诱导慢性结肠炎和纤维化。针对食物和流体的摄取来监测动物,并在研究开始时以及此后规律地每 3 天一次对小鼠进行称重。

[0241] 试验设计

[0242] 将小鼠随机分为 2 组 :i. DSS 和 ii. DSS+GED。各组由 25 只小鼠组成并与 10 只对照动物相比,其中所述的对照动物仅接受水。将 GED(30mg/kg/ 只小鼠) 溶解于包含 0.5% 羧甲基纤维素钠盐 (CMC ;MW:90,000Da ;Sigma Aldrich) 和 1% Tween80 的溶液中,并通过口服填喂法每日施用所述的 GED(100μl/ 只小鼠)。在第二个周期开始时施用 GED。

[0243] 结肠炎过程的评估

[0244] 每日针对流体的摄取、体重的变化来观察动物,并针对结肠炎的迹象 (包括体重的损失、腹泻、直肠出血和脱垂) 以及系统性炎症的迹象 (例如毛发直立、昏睡和眶周渗出物) 来检查动物。

[0245] 样品的回收和制备

[0246] 最后,在末次 DSS 周期施用后的 7 天,通过在深度 CO_2 麻醉下折颈法处死各组动物,并实施剖腹手术。观察结肠并快速切除。测量整个结肠 - 直肠的长度,以及结肠 - 直肠的末端 8cm 的重量。

[0247] 宏观和微观的结肠损伤的评估

[0248] 由独立的观察者,在不知道小鼠治疗的情况下,对宏观的结肠损伤 (包括扩张、厚度和狭窄) 进行评分。将由结肠得到的组织样本切开,并立即冷冻或在室温下在新鲜的 4% 福尔马林 (FA)/PBS 溶液中固定 3h,然后通过标准的程序进行石蜡包埋。将以 3μm 横向切片的石蜡包埋组织进行苏木精 / 伊红染色以便评估炎症的程度,以及马松三色染色以便更好地评估结缔组织和纤维化。然后,由 2 名病理学家在 Olympus BX51Light Microscope(Olympus,Optical Co.Ltd.,Tokyo,Japan) 下,盲态观察染色的切片,其中所述的病理学家进行组织学评分评价 :i. 存在溃疡 (0 = 无,1 = 小溃疡,2 = 大溃疡);ii. 炎症的程度 (0 = 无,1 = 轻微,2 = 中度,3 = 重度);iii. 损伤的深度 (0 = 无,1 = 粘膜下层中扩张的损伤,2 = 固有肌层中的损伤,3 = 浆膜中的损伤);iv. 纤维化的程度 (0 = 无,1 = 轻微,2 = 中度,3 = 重度)。根据慢性炎症浸润的强度和程度、杯状细胞的损失及肠壁增厚的情况来评估肠炎的程度。获得总微观评分作为所有分数的总和 (可能的最大评分 = 10)。

[0249] 根据三色阳性的结缔组织染色的强度和程度及组织结构的破坏,将肠纤维化评分为无、轻微或严重。

[0250] 免疫组织化学

[0251] 将由结肠得到的组织样本 (切开并在室温下在新鲜的 4% 福尔马林 (FA)/PBS 溶液中固定 3 小时) 在梯度乙醇系列中脱水,并包埋于低温融合的石蜡中。将 3μm 厚的切片在由甲醇和 3% 过氧化氢构成的溶液中温育 45min。

[0252] 将样品与针对以下的特异性抗体 :α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA,Abcam)、I-III 型胶原蛋白 (Abcam)、TGF-β1(Abcam)、结缔组织生长因子 (CTGF)(Abcam)、pSmad3 和 Smad3(Cell Signaling)、Smad7(Imgenex) 和 PPARγ (Cell Signaling) 温育过夜。将样品用 PBS 洗涤 5min,并与链霉亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶缀合的二级抗体 (Dako LSAB

Corporation,cod K0675,Dako-Cytomation,Milano) 温育。在 PBS 中进行 10min 洗涤一次后,将切片与 3,3-二氨基联苯胺-四氢氯化物温育 1-3min。通过苏木精-伊红得到核的对比染色。省略一级抗体,表现免疫反应的特异性。最后使用 Mayer 的苏木精染色样品并在 Olympus BX51Light Microscope(Olympus,Optical Co.Ltd.,Tokyo,Japan) 下观察。

[0253] Western 印迹分析

[0254] 切割 0.5cm 冷冻的结肠样品,并将其在 RIPA 缓冲剂中以机械方式匀质化,其中所述的 RIPA 缓冲剂包含 50mM TrisHCl pH7.6、150 mM NaCl、1.5mM $MgCl_2$、5mM EDTA,1% Triton-X 和 10% 甘油,其中补充有 100mM 氟化钠 (NaF)、2mM 原钒酸钠 (Na_3VO_4)、10mM 焦磷酸钠 (NaPPi)、1mM 苯基甲基磺酰氟 (PMSF) 和传统的蛋白酶抑制剂混合物 (包含 10μg/mL 亮肽酶素和抑肽酶)。

[0255] 对各样品,通过 PAGE 分离 30μg 蛋白质,并进行电印迹。将 100% 纯的硝酸纤维素膜与针对 TGF-β1、CTGF、α-SMA、胶原蛋白-I、GAPDH 的一级抗体 (购自 Abcam,Cambridge,UK ; 在 RT 下以 1:1000 进行 2h) 和针对 IL-13 的一级抗体 (购自 Antibodies online ; 在 RT 下以 1:1000 进行 2h) 温育 (根据各抗体的特定方案),其中所述的一级抗体稀释于 0.1% TBS-t 中的 5% 脱脂牛奶中。随后将膜在 TBS-t0.1% 中洗涤,并与二级辣根过氧化物酶缀合的抗体 (抗兔和抗小鼠 ;Sigma Aldrich ; 在 RT 下以 1:20000 进行 1h) 温育,其中所述的二级抗体稀释于 0.1% TBS-t 中的 5% 脱脂牛奶中。最后,使用 SuperSignal West Pico 化学发光底物 (Thermo Scientific Pierce,Erembodegem),根据制造商提供的方案进行免疫检测。将膜暴露于放射自显影膜 (Fuji Photo Film Co.,Dusseldorf,Germany)。使用计算机辅助的密度计和 ImageJ 公共软件 (W.S.,Rasband,ImageJ,U.S.National Institutes of Health,Bethesda,MD ;http://rsb.info.nih.gov/ij/,1997-2011) 测定目标条带的光密度。将组织水平表示为光密度 (OD) 单位 / 总蛋白质的数量,并根据内部对照 GAPDH 进行归一化,再将结果表示为对照组的百分率。

[0256] 体内实验

[0257] 细胞培养

[0258] 使人类结肠癌细胞系 HT-19(ATCC HTB-38) 和结肠成纤维细胞 (ATCC 人类 CDD-18co) 分别在杜氏改良伊戈尔培养基 (DMEM) 和 Alpha 改良伊戈尔培养基 (Alpha-Modified Eagle's medium) 中生长,100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素补充有 10% 胎牛血清 (FBS)。将细胞培养物保持在 37℃下、95% 空气和 5% CO_2 的潮湿气氛中。

[0259] PPARγ 敲减细胞的生成

[0260] 使用 pSUPER 逆转录系统 (OligoEngine) 获得 PPARγ 敲减的 HT29。将相当于人类 PPARγ mRNA 的核苷酸 105-123(5'-GCCCTTCACTACTGTTGAC-3'(SEQ ID NO:11)) 的正向和反向目标序列克隆到 pSUPER 逆转录载体 (pRS) 的 BglII/XhoI 限制性位点中,从而得到 ShPPAR 构建体。此外,还生成阴性对照 pRS 质粒 (ShLuc 构建体),其包含靶向针对荧光素酶基因的序列 5'-ACGCTGAGTACTTCGAAAT-3'(SEQ ID NO:12)。使用得自 AmaxaBiosystems 的 Nucleofector 技术,根据制造商的方案,使 2 种构建体转染 HT-29 和 Caco-2 细胞。使用补充有嘌呤毒素 (5μg/ml) 的完全培养基,在转染后的 24h 选择稳定转染的克隆。通过定量 RT-PCR 和 Western 印迹分析检查 PPARg 表达的沉默情况。一旦 ShPPAR 和 ShLuc 细胞系

建立，则将它们保持在补充有 2.5μg/ml 嘌呤毒素的完全培养基中。

[0261] 实验设计

[0262] 通过使用 1ng/mL 和 10ng/mL 的 TGF-β（溶解于不含血清的培养基中）分别刺激 hCCD-18 和 HT29 达 4 天来诱导纤维化表现型。在分化期间施用 1mM 的 GED(195.22g/mol)。此外，对 PPARγ 激活的潜在依赖已经通过使用 GW9662（该受体的特异性拮抗剂）进行了研究。在开始 TGFβ 诱导的分化之前 4h 已经施用 10^{-5}M 的 GW9662。

[0263] 定量 RT-PCR

[0264] 使用 Nucleospin RNA 试剂盒 (Macherey-Nagel,Hoerdt,France) 提取总 RNA。在 RNAse 失活后，通过 DNAse 处理清除总 RNA 中的痕量基因组 DNA，并在不含 RNAse 且不含 DEPC 的水中洗脱。通过 UV 分光光度计在 Nanodrop 系统上由 220 至 350nm 评价 RNA 的纯度，并在 Agilent2100 生物分析仪上绘制图谱。通过使用得自 Roche Diagnostics(Indianapolis,IN) 的 LightCyclerFastStart DNA Master SYBR Green I，根据制造商提供的方案，使用 1μg 总 RNA 来实施定量 RT-PCR。

[0265] 结果

[0266] 体内实验

[0267] 关于小鼠中慢性结肠炎的临床和宏观发现

[0268] 由第一个 DSS 周期的最后一天（第 5 天）开始，在所有的慢性小鼠中，慢性口服施用 DSS 都会诱导体重损失。在第 10 天时，与对照小鼠相比，接受 DSS 的小鼠显示更低的体重，它们的值分别为 23.88±0.31（接受 DSS 的小鼠）与 25.27±0.35（对照小鼠），$p<0,05$（图 11）。

[0269] 在 DSS 口服施用的第 7 天，在 70％的 DSS 处理小鼠和 50％的 GED 小鼠中观察到中度至中度的腹泻。在同期，在 40％的 DSS 小鼠和 30％的 GED 小鼠中观察到系统性的表现，例如毛发直立、眶周渗出物和 / 或昏睡。在任何阶段都没有观察到由明显的直肠出血或直肠脱垂。分别在第 15 天和第 30 天处死小鼠，并通过测量结肠的重量（是指末端大肠的最后 8cm) 和结肠的长度，以及通过观察粘连、狭窄、扩张、厚度的存在情况来宏观评价结肠，如果无这些情况，则评分为 0；如果这些情况为轻微或中度，则评分为 1；如果这些情况为重度，则评分为 2。所有这些评分的总和计算为总的宏观评分。

[0270] 在过程中施用 GED 的作用以及在小鼠中 DSS 诱导的慢性结肠炎的宏观发现概括于表 7 中，表明 GED 减轻宏观损伤及慢性 DSS 诱导的结肠炎，并减少纤维化的形态学迹象。

[0271] 在 DSS 治疗中观察到的所有宏观特征显示，在 2 种模型中具有显著的改变，这些改变表明 DSS 诱导严重的组织损伤的有效能力。所有的宏观损伤都可以通过 GED 治疗而减轻，从而确定 DSS 与 DSS+GED 的总宏观评分之间的显著差异。结肠重量和结肠重量 / 体重比显示在 GED 治疗后无显著改变，而结肠的长度显示明显的恢复。对结肠的直接观察显示，实际上在多数 DSS 处理的样品中都具有明显的缩短和扩张，并且这些特征在 GED 处理的小鼠中减轻。

[0272] 表 7. 在试验过程中施用 GED 的作用及慢性结肠炎的宏观发现

[0273]

	慢性的		
参数	H_2O	DSS	DSS + GED
DSS 治疗的过程	30 天	30 天	15 天
死亡率（n 只小鼠）	0	2	0

[0274]

体重	28,95 ± 0,331	25,93 ± 0,223**	25,132 ± 0,458**
结肠重量	0,171 ± 0,005	0,283± 0,006***	0,269 ± 0,007***
结肠重量/体重比	0,29 ± 0,0051	0,26 ± 0,007**	0,27 ± 0,012**/^{YY}
结肠长度	8,52 ± 0,093	6,304 ± 0,0,09**	7,092 ± 0,16**/
扩张	np	1,35 ± 0,165**	1,12 ± 0,185**/^{YY}
厚度	np	1 ± 0,154**	0,48 ± 0,108**/^{Y}
狭窄	np	0,364 ± 0,151**	0,32 ± 0,114**/^{Y}
粘连	np	0,348 ± 0,135**	0,12 ± 0,1^{YY}
总的宏观评分	np	3,112 ± 0,31 **	2,02 ± 0,26** /^{YY}

[0275] 数据表示为平均值 ±SEM ;np ＝不存在 ;* ＝ p<0.05 对比 H_2O ;** ＝ p<0.01 对比 H_2O ;*** ＝ p<0,005 对比 H_2O ; ^{Y}＝ p<0.05 对比 DSS ; ^{YY}＝ p<0,01 对比 DSS ; ^{YYY}＝ p<0,005 对比 DSS。

[0276] 因此，结肠的重量 / 尺寸比被用作炎症和纤维化的水平的另一个指示剂。与仅接受常规水的对照小鼠相比，在接受 DSS 的小鼠中观察到重量 / 尺寸比显著增加 124％，它们的值分别为 44.98±6.31（接受 DSS 的小鼠）与 20.11±3.91（仅受常规水的小鼠）(p<0.05)。GED 导致结肠的重量 / 尺寸比与 DSS 小鼠相比显著降低 (38.13±7.82 与 44.98±6.31(p<0.05))，从而相对于 DSS 的促纤维化作用而言，降低 26％。因此，GED 能够降低纤维化的形态学迹象，例如结肠的缩短和增厚。

[0277] 关于慢性结肠炎的显微发现

[0278] 根据粘膜中细胞浸润的强度、粘膜下层中炎症的扩张以及上皮损伤和胶原蛋白沉积的存在情况对多个组织学参数进行评分。与接受常规水的对照小鼠相比，在接受 DSS 的小鼠组中观察到显著的且强烈的炎症。2 种模型中的组织学特征显示粘膜溃疡和恶化、杯状细胞的减少、广泛的炎症细胞浸润和粘膜下水肿。所有这些发现在 DSS 诱导的慢性结肠炎中都表现得更加突出，并且结肠壁的广泛增厚是明显的。此外，慢性模型显示，在长期治疗中，隐窝的明显再生并且炎症程度的可能自发恢复（图 12)。

[0279] 通过马松三色染色（对胶原蛋白沉积具有特异性）观察纤维化的水平。与对照小鼠相比，纤维化水平的显著增高不仅在 DSS 小鼠的结肠中观察到，而且在 2 个治疗组之间观察到（图 12)。该证据以及所 观察到的更低的炎症程度似乎符合这样的假设 :纤维化开始于炎症应答，但是随后可以独立于炎症应答而发展。

[0280] 指定总的显微评分，并且证明由 1 和 3 个周期的 DSS 诱导的高的炎症程度和纤维化的水平在每日口服施用 GED 后显著降低 (GED :3.36±0.55 ;DSS :6.45±0.82，p<0.01)（图 12)。

[0281] 主要纤维化标志物的组织水平的评价

[0282] 通过免疫组织化学分析来评价 DSS 诱导的结肠炎的慢性模型中纤维化的主要标志物的组织水平，并通过免疫印迹来证明。因此，观察到与仅接受 DSS 的小鼠相比，在经历口服施用 GED 治疗的小鼠的结肠中，胶原蛋白 I-III（图 13a）和 α-SMA（图 13b）（其为成纤维细胞分化的特异性标志物）的明显减少。对 6 只对照小鼠、8 只 DSS 小鼠和 8 只 DSS+GED 小鼠来测量胶原蛋白 I-III 和 α-SMA 的表达水平。免疫化学和 Western 印迹显示与接受常规水的对照小鼠相比，在接受 DSS 的小鼠组中，所有主要的纤维化标志物均显著增多，并且每日施用 GED 与所述的标志物的表达减少有关。各蛋白质的表达水平表示为对照组的平均值的百分率，并且将所关注的各标志物参照管家蛋白质（例如 GAPDH）归一化。观察到与对照组相比，在 DSS 小鼠中，胶原蛋白 I-III 的表达显著增多（184％），并且对 α-SMA 中度的上调达 25％。对患有 DSS 诱导的慢性结肠炎的小鼠口服施用 GED 导致所述的这些蛋白质的表达水平降低，更明显降低的是胶原蛋白 I-III（GED：90.75％ ±19.9％；DSS：284.4％ ±63.8％，$p<0.005$）。

[0283] GED 控制了 TGFβ/Smad 途径及其特异性的激活剂 IL13

[0284] GED 在不同水平下控制 TGFβ/Smad 途径的能力是通过免疫组织化学分析观察到的，并且证明与该途径有关的不同成员显著减少，例如 TGF-β1、Smad3、CTGF（数据未示出）。

[0285] 观察到 GED 在预防或治疗肠纤维化（与 IL-13 表达水平的改变有关）的益处（图 14a）。IL-13 是 TGFβ/Smad 途径的特异性激活剂，并且这一方面是通过 TGF-β1（图 14b）和 CTGF（图 14c）表达水平的随后发生降低来证明的。DSS 小鼠中 IL-13 的表达增加通过口服施 用 GED 而明显恢复（GED：88.88％ ±14.01％；DSS：189.5％ ±28.71％，$p<0.01$）。TGF-β1 和 CTGF 表达水平的随后降低是通过免疫印迹分析来证明的，并且对于 CTGF 是明显的（GED：55.57％ ±17.53％；DSS：115.1％ ±16.88％，$p<0.05$）。在与对照组的比较中，所述的表达水平表示为光学密度的百分率，并且根据 GAPDH 进行归一化。

[0286] 以引用方式并入

[0287] 就所有目的而言，本文所涉及的每一份专利文件和科学文章的全部公开内容均以引用方式并入本文。

[0288] 等价物

[0289] 本发明可以在不脱离本发明的精神或实质特征的条件下以其他特定的形式体现。因此，之前的实施方案在所有的方面都被认为是示例性的，而非限定了本文所述的发明。因此，本发明的范围是通过所附的权利要求书来表明的，而非通过之前的描述，并且在权利要求书的等价含义和范围内的所有改变都将涵盖在本发明的范围内。

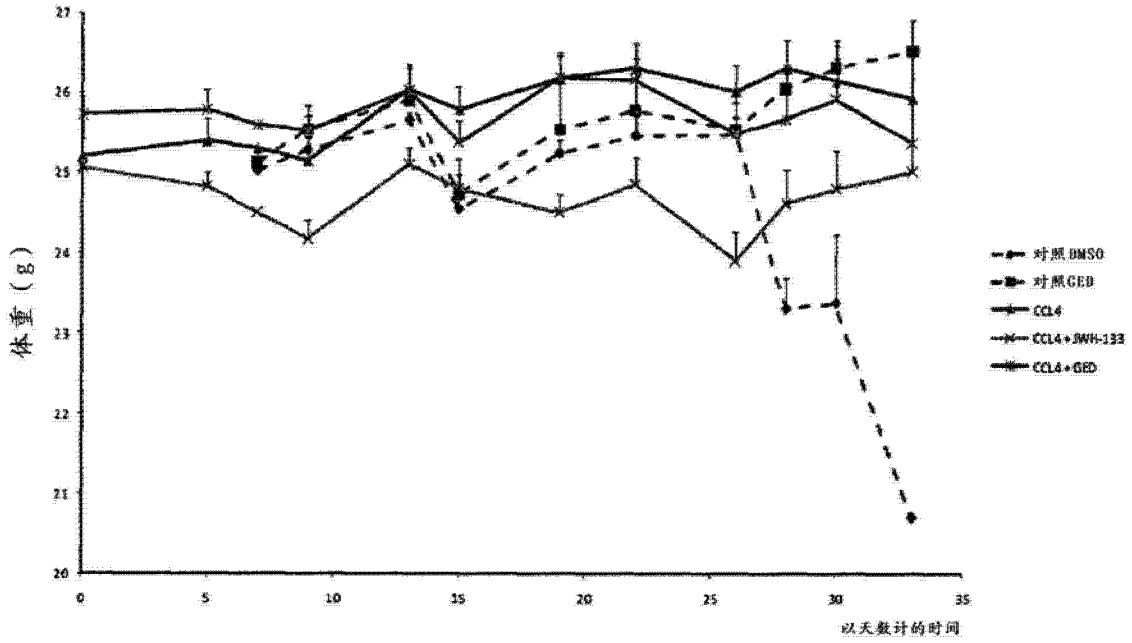


图 1

Metavir 评分（活性 A0→A3 和纤维化 F0→F4）		
	活性（坏死和炎症）	纤维化
0	A0	FO
低	A1	F1
中	A2	F2
重	A3	F3
肝硬化		F4

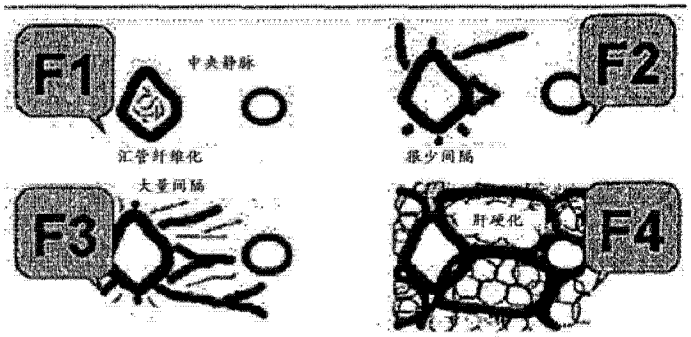


图 2A

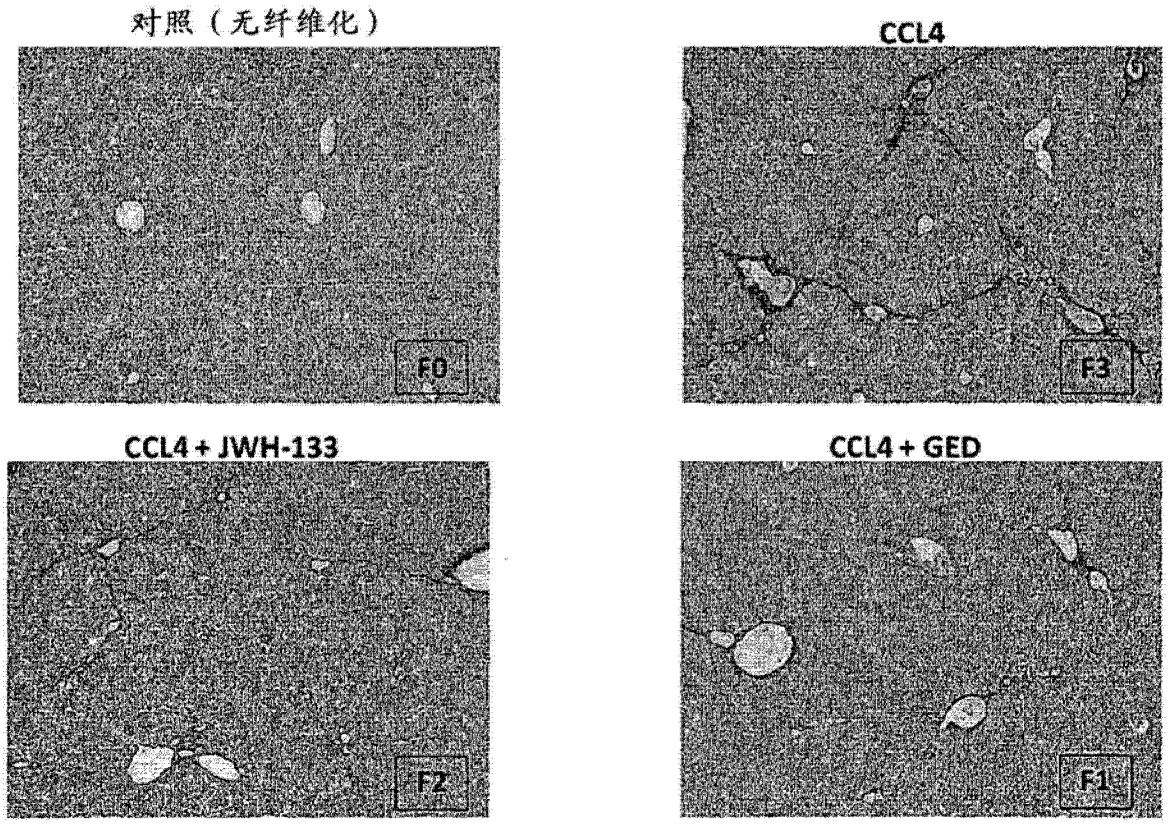

对照（无纤维化）
F0
CCL4
F3
CCL4 + JWH-133
F2
CCL4 + GED
F1

图 2B

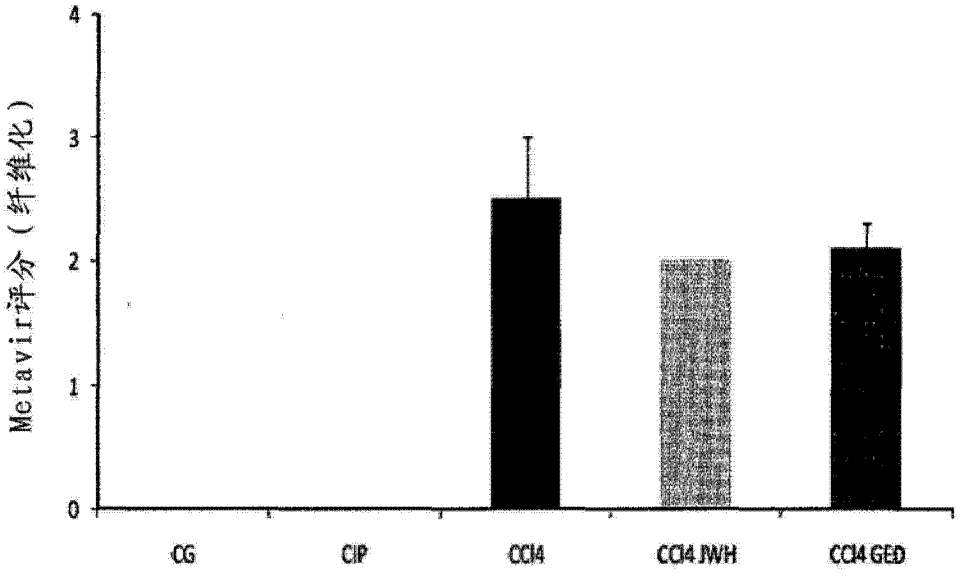

Metavir评分（纤维化）
0
1
2
3
4
CG
CIP
CCl4
CCl4 JWH
CCl4 GED

图 3A

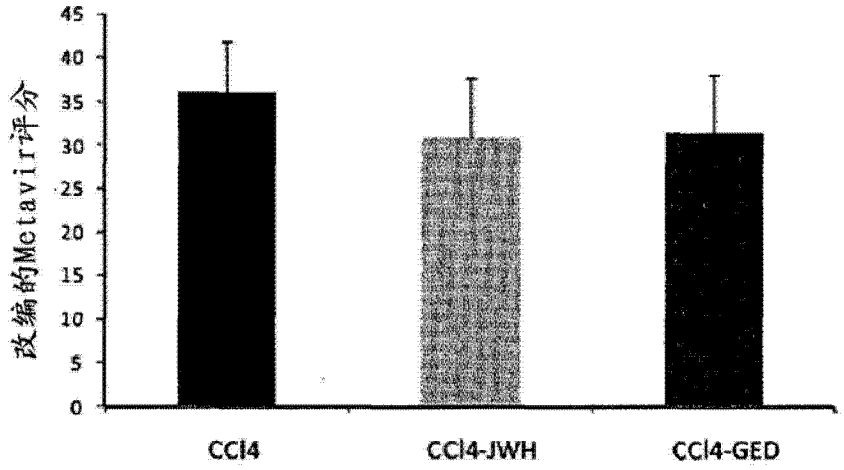

改编的Metavir评分
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
CCl4
CCl4-JWH
CCl4-GED

图 3B

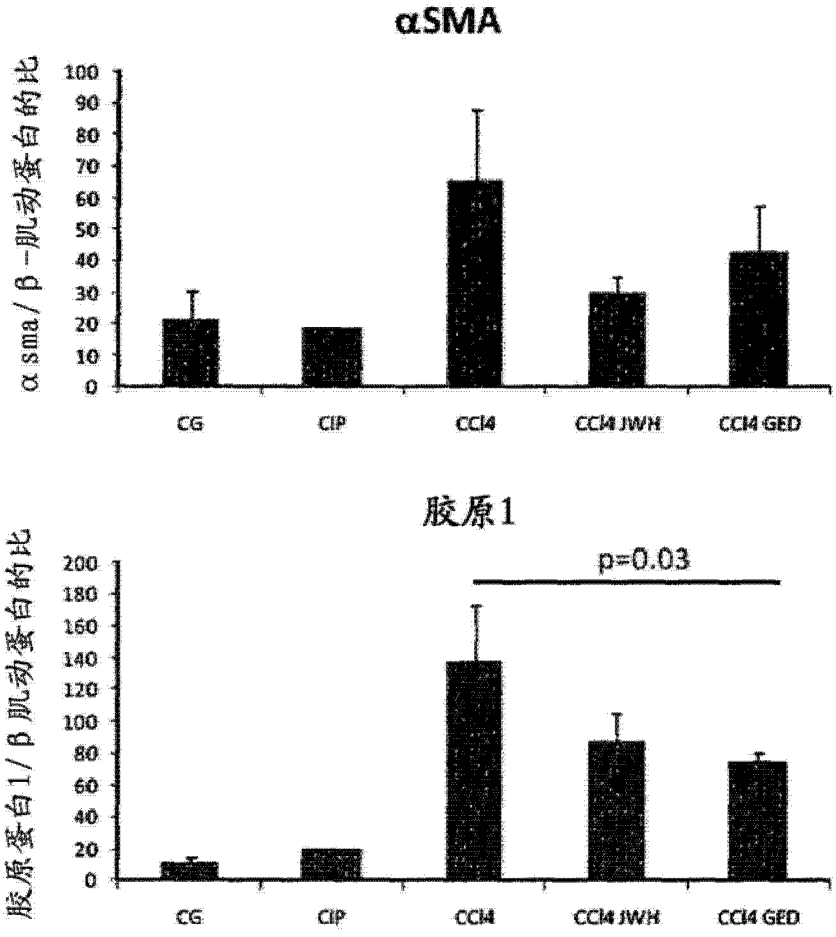

αSMA
α sma/β-肌动蛋白的比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CG
CIP
CCl4
CCl4 JWH
CCl4 GED
胶原1
胶原蛋白1/β肌动蛋白的比
p=0.03
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
CG
CIP
CCl4
CCl4 JWH
CCl4 GED

图 4

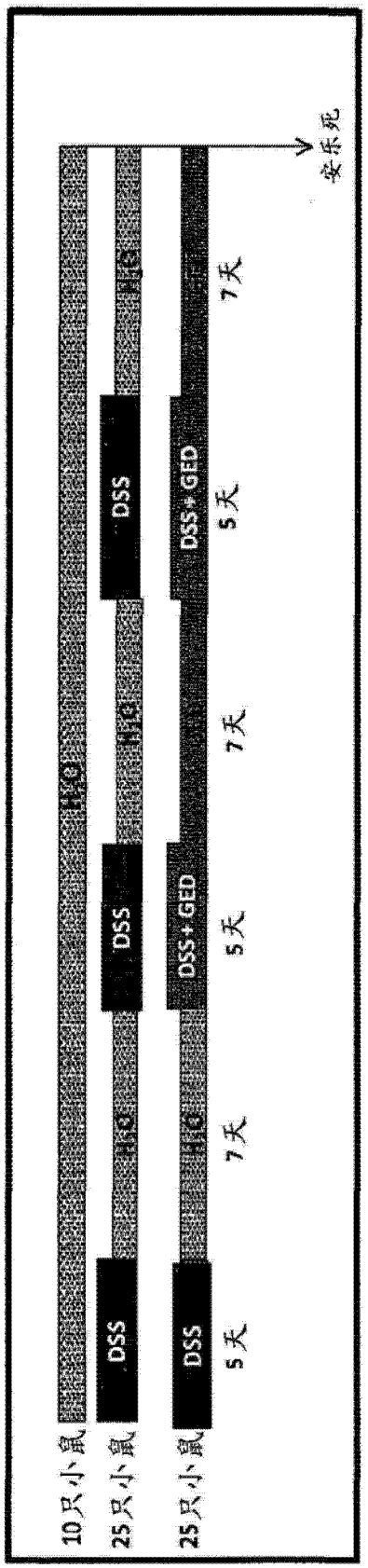

10只小鼠
25只小鼠
25只小鼠
H2O
DSS
H2O
DSS
H2O
DSS
H2O
DSS+GED
H2O
DSS+GED
5天
7天
5天
7天
5天
7天
安乐死

图 5

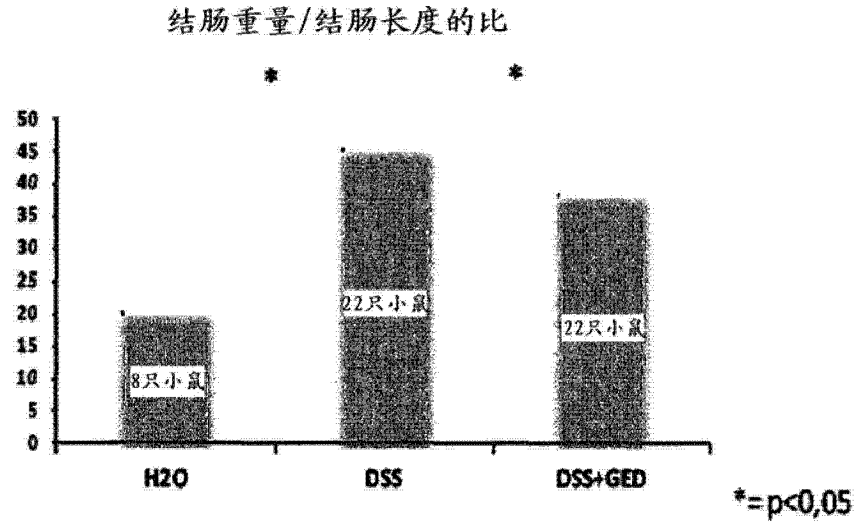

结肠重量/结肠长度的比
*
*
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
8只小鼠
22只小鼠
22只小鼠
H2O
DSS
DSS+GED
*=p<0,05

图 6A

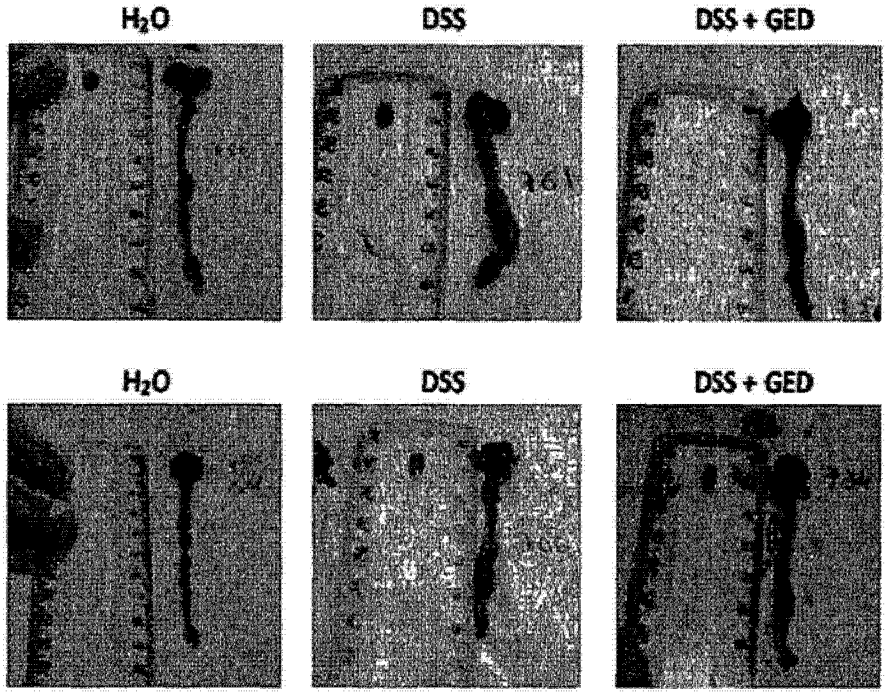

H2O
DSS
DSS + GED
H2O
DSS
DSS + GED

图 6B

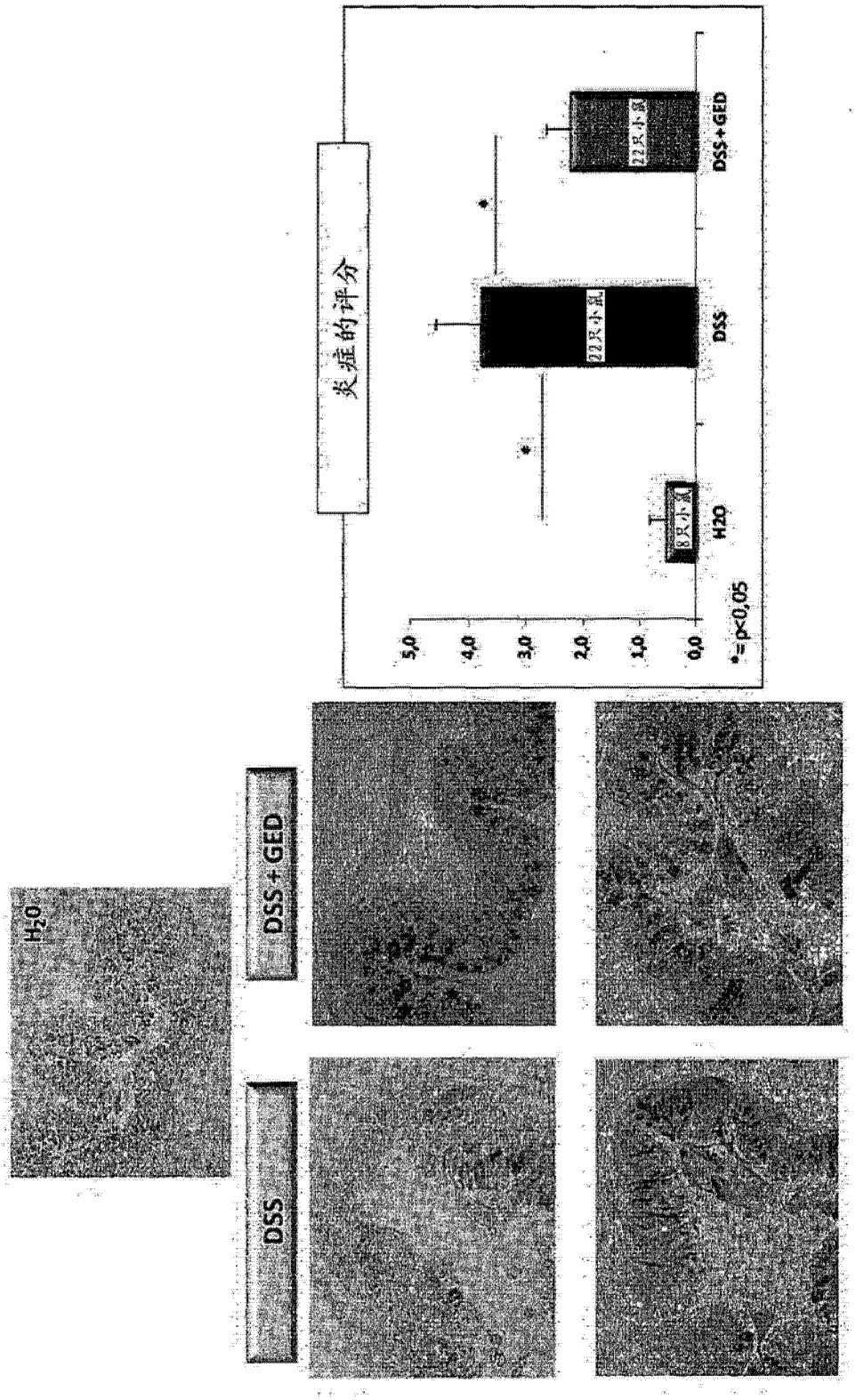

炎症的评分
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
*= p<0,05
H20
DSS
DSS+GED
8只小鼠
22只小鼠
22只小鼠
22只小鼠
H2O
DSS
DSS+GED

图 7

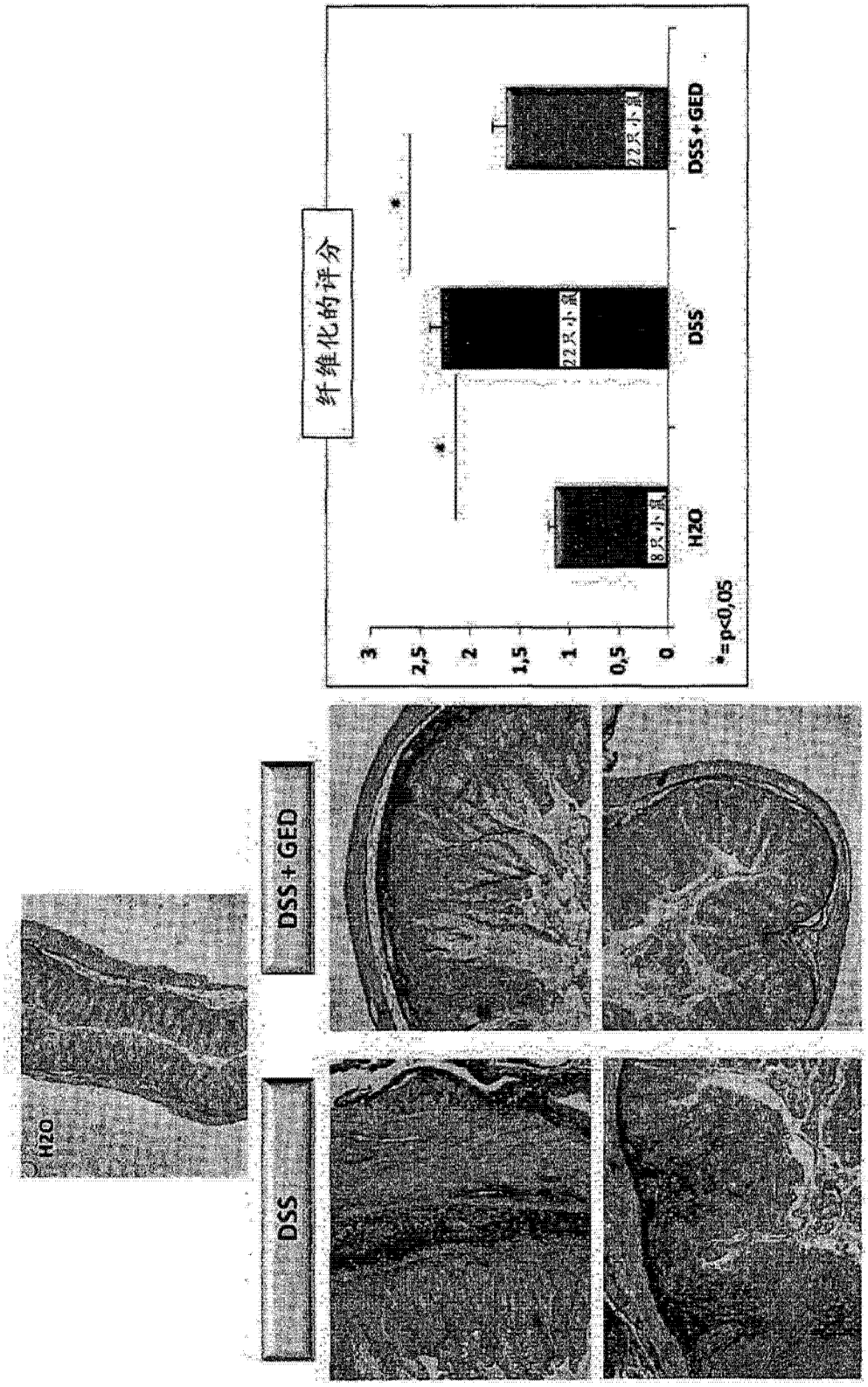

纤维化的评分
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*= p<0,05
H2O
DSS
DSS+GED
8只小鼠
22只小鼠
22只小鼠
22只小鼠
H2O
DSS
DSS+GED

图 8

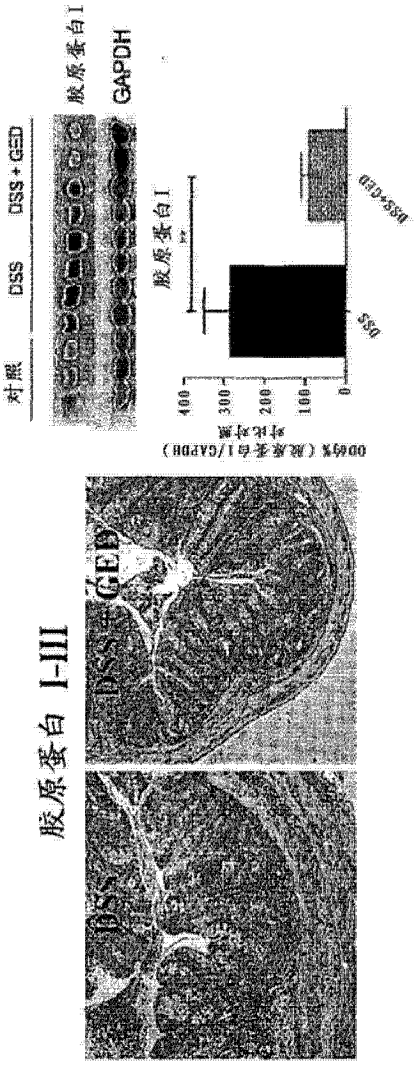

对照
DSS
DSS+GED
胶原蛋白I
GAPDH
胶原蛋白I
DSS
DSS+GED
400
300
200
100
0
OD值（胶原蛋白I/GAPDH）
对比对照
胶原蛋白 I-III
DSS+GED
DSS

图 9A

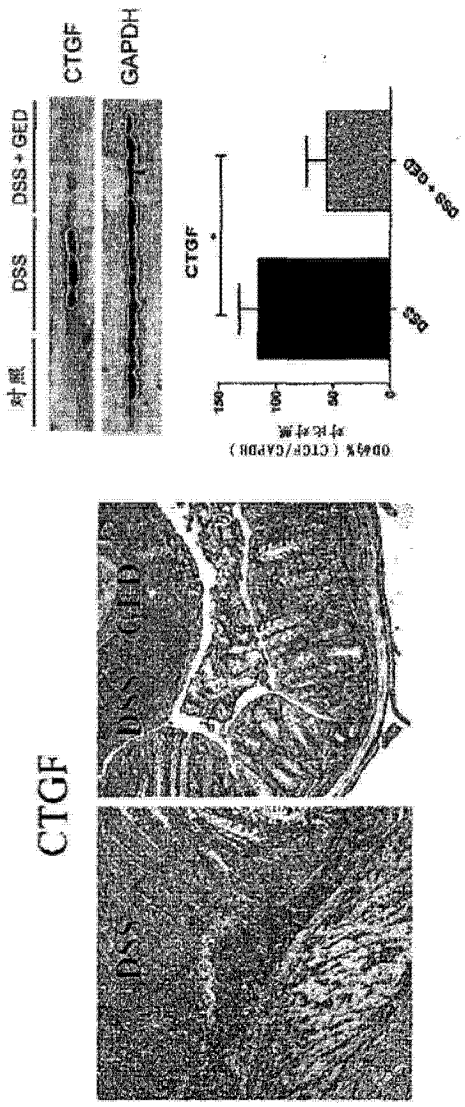

对照
DSS
DSS+GED
CTGF
GAPDH
CTGF
DSS
DSS+GED
150
100
50
0
OD值（CTGF/GAPDH）
对比对照
CTGF
DSS
DSS+GED

图 9B

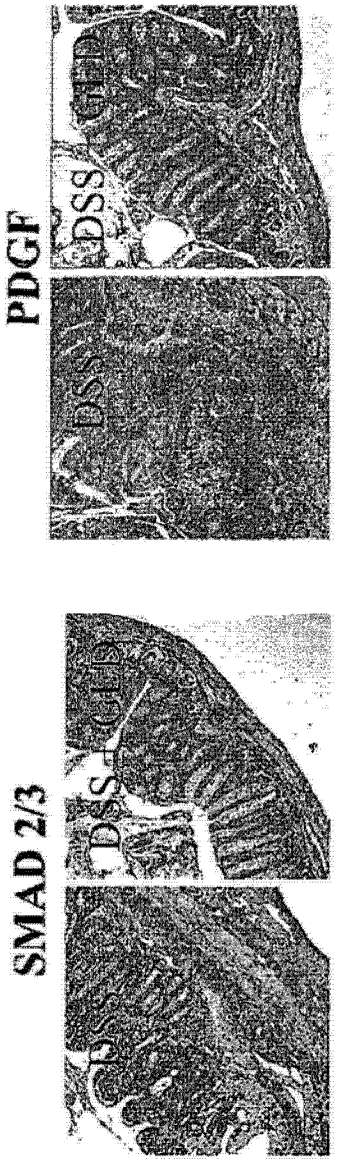

PDGF
DSS+GED
DSS
SMAD 2/3
DSS+GED
DSS

图 9C

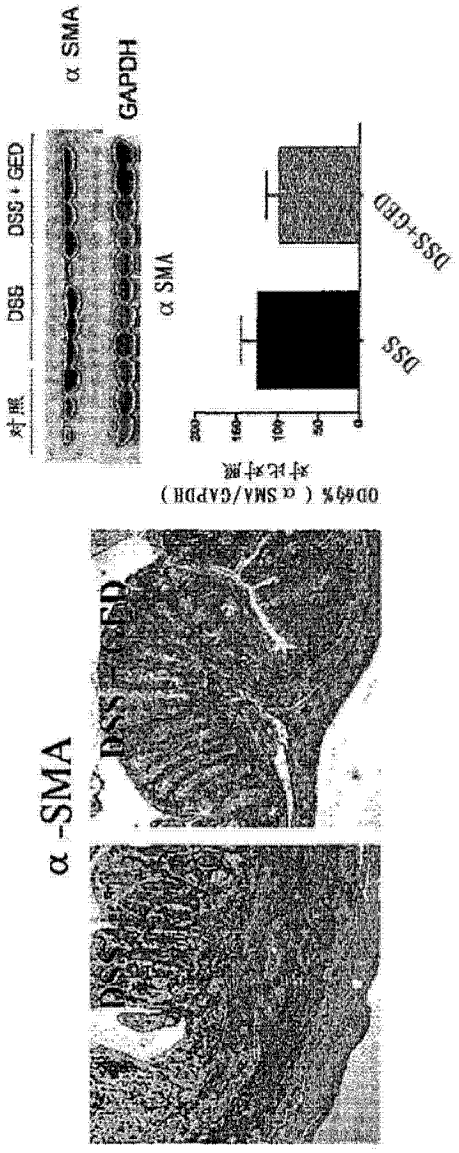

α SMA
GAPDH
对照
DSS
DSS + GED
α SMA
OD49% (α SMA/GAPDH)
对比对照
200
150
100
50
0
DSS
DSS+GED
α -SMA
DSS+GED
DSS

图 9D

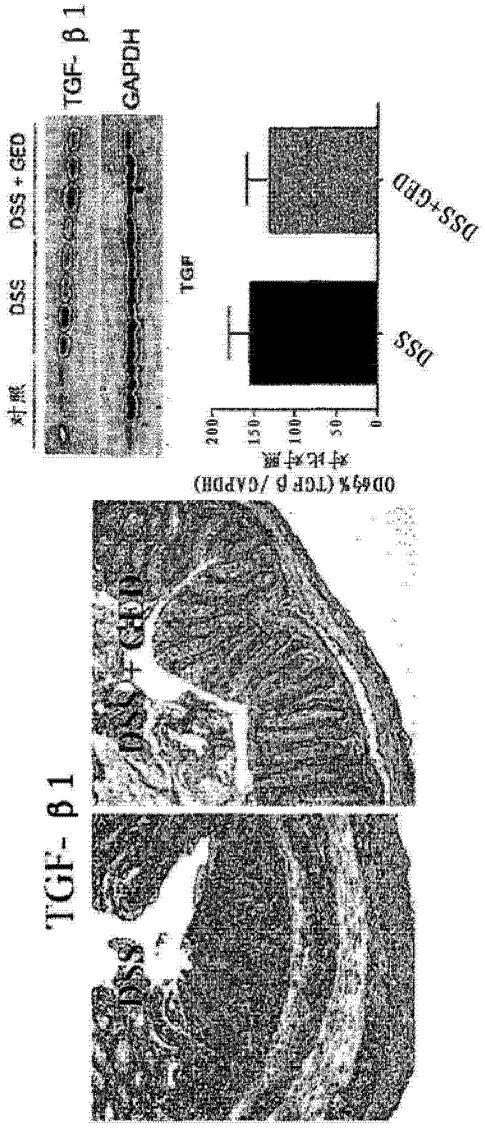

TGF- β 1
GAPDH
对照
DSS
DSS + GED
TGF
DSS
DSS+GED
200
150
100
50
0
OD495 (TGF β /GAPDH)
对比对照
TGF- β 1
DSS
DSS + GED

图 9E

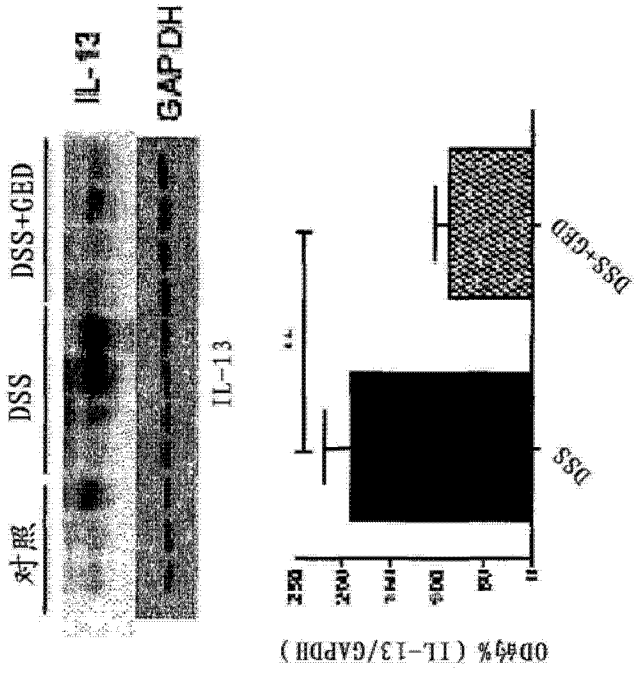


图 10

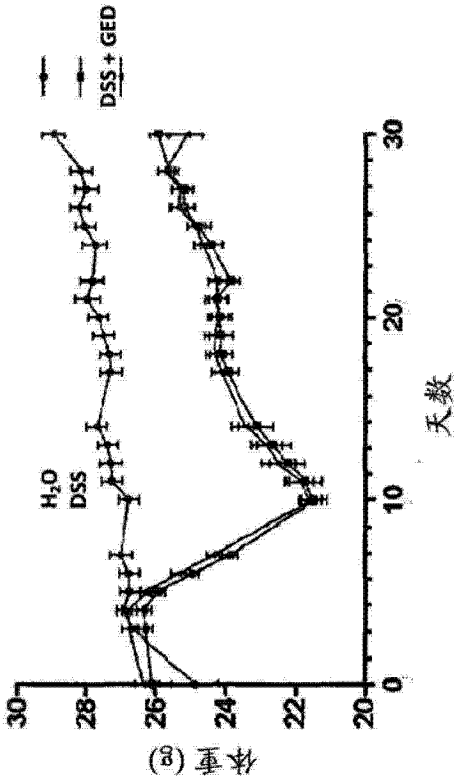

DSS + GED
H2O
DSS
体重 (g)
天数
30
28
26
24
22
20
0
10
20
30

图 11

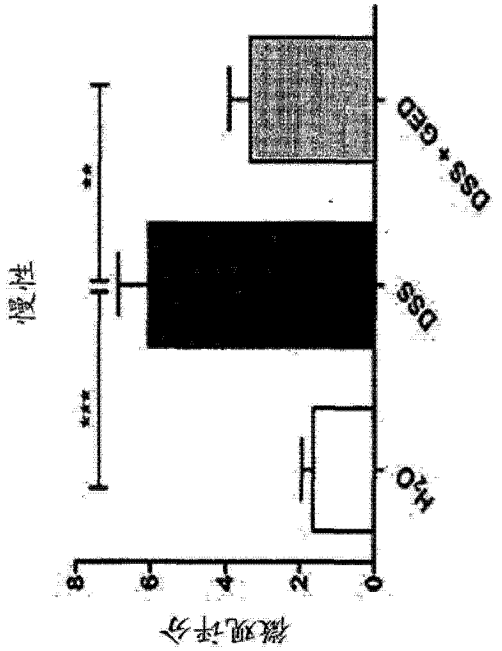

DSS + GED
DSS
H2O
慢性
微观评分
**
***
0
2
4
6
8

图 12

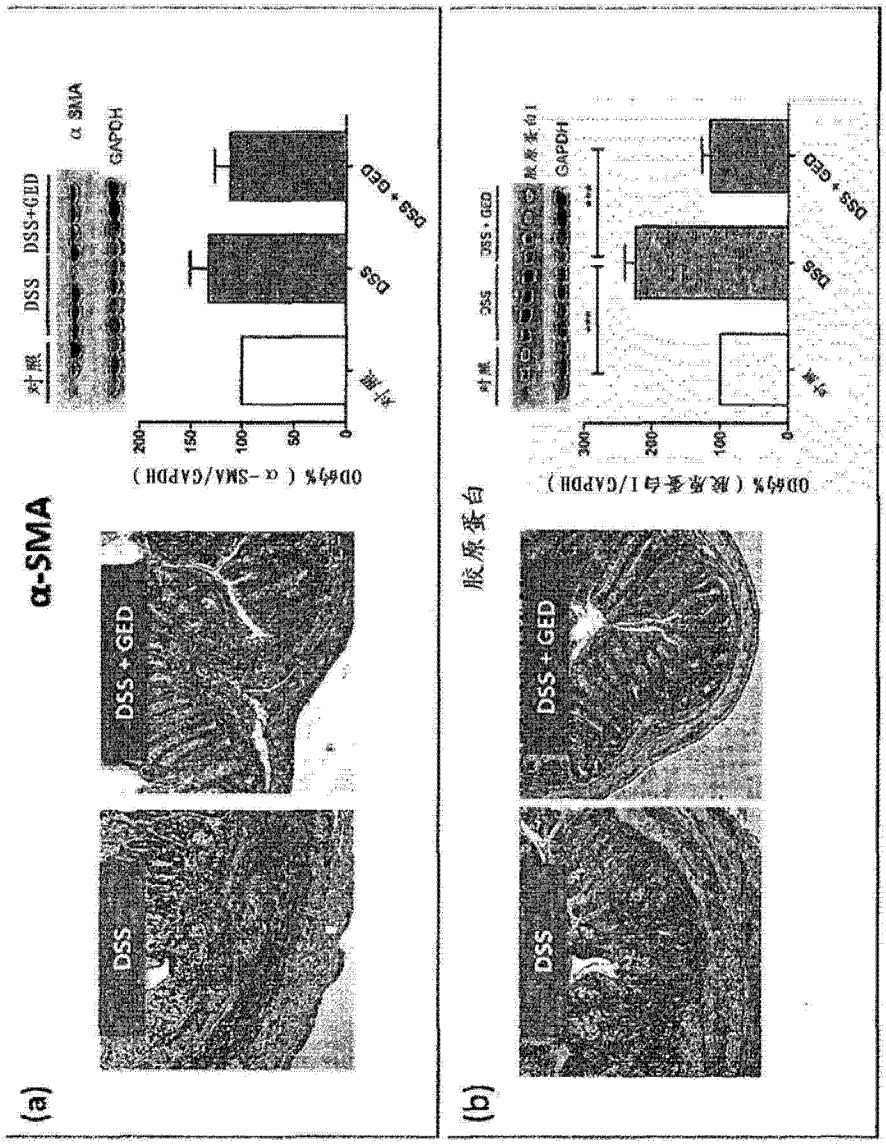

(a)
α-SMA
DSS
DSS + GED
对照
DSS
DSS+GED
α SMA
GAPDH
OD值% (α-SMA/GAPDH)
200
150
100
50
0
对照
DSS
DSS + GED
(b)
胶原蛋白
DSS
DSS + GED
对照
DSS
DSS+GED
胶原蛋白I
GAPDH
OD值% (胶原蛋白I/GAPDH)
300
200
100
0
***
***
对照
DSS
DSS + GED

图 13

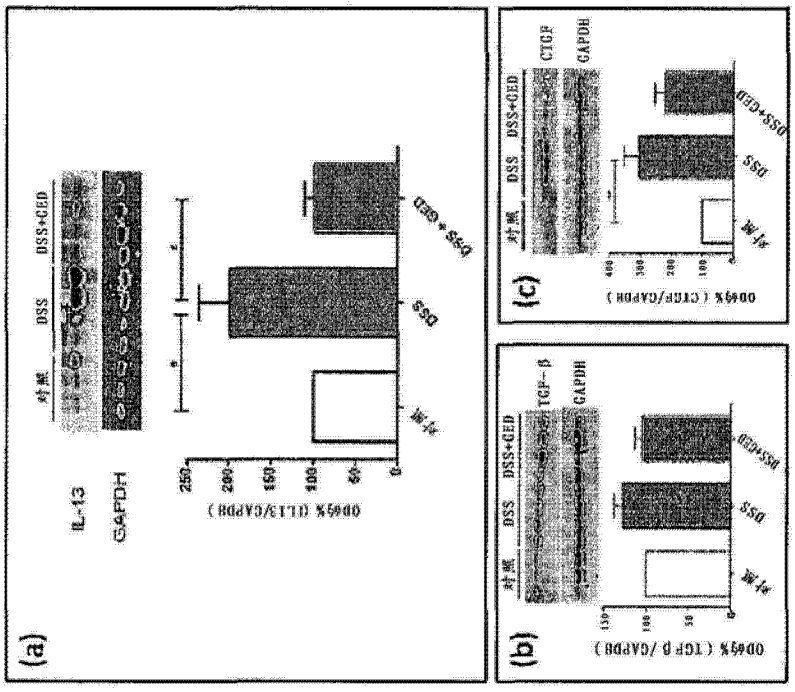

(a)
对照
DSS
DSS+GED
IL-13
GAPDH
OD65% (IL13/GAPDH)
250
200
150
100
50
0
*
*
对照
DSS
DSS+GED
(b)
TGF-β
GAPDH
OD65% (TGF β /GAPDH)
150
100
50
0
对照
DSS
DSS+GED
(c)
CTGF
GAPDH
OD65% (CTGF/GAPDH)
400
300
200
100
0
对照
DSS
DSS+GED

图 14

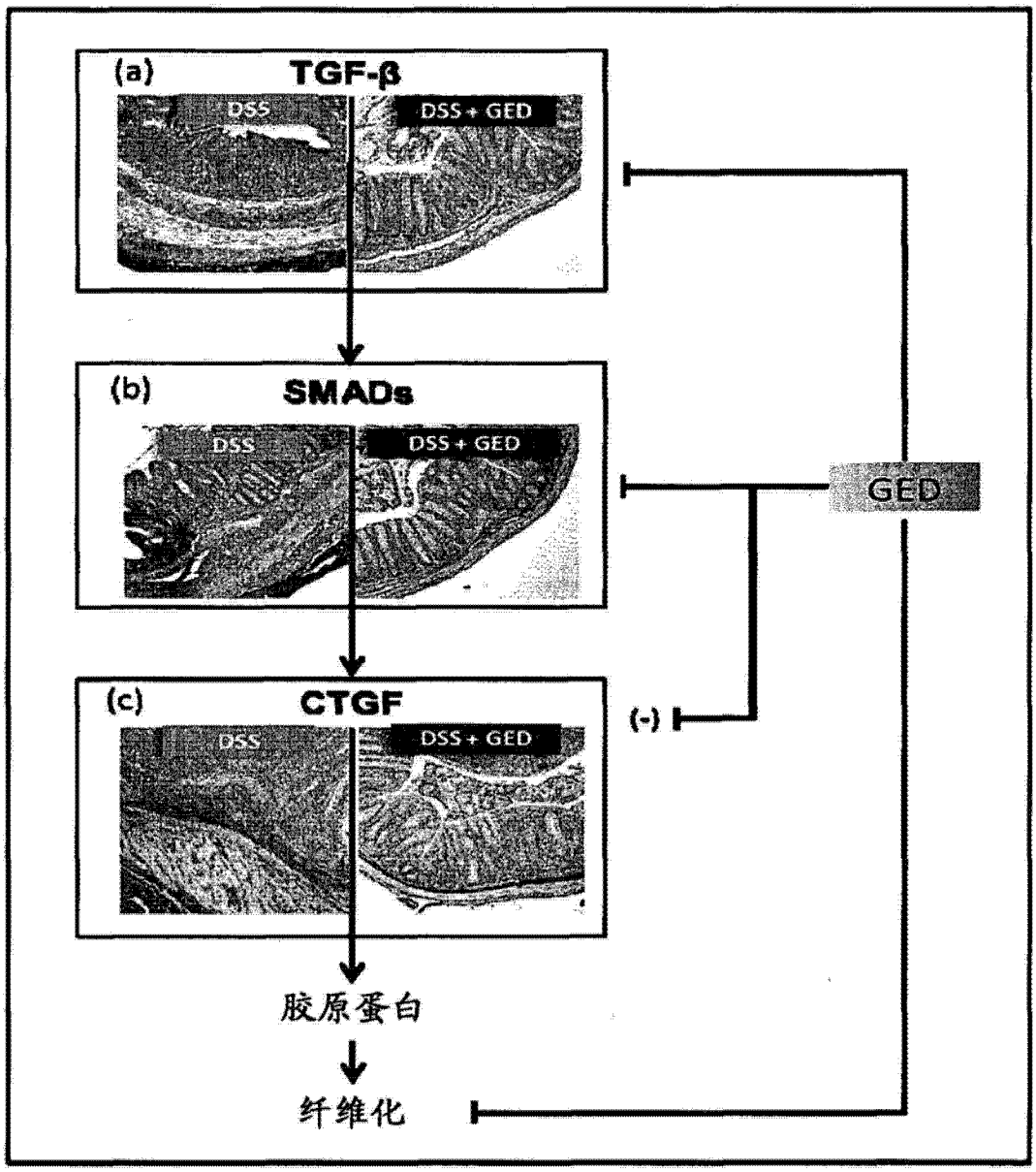

(a)
TGF-β
DSS
DSS + GED
(b)
SMADs
DSS
DSS + GED
GED
(c)
CTGF
DSS
DSS + GED
(-)
胶原蛋白
纤维化

图 15

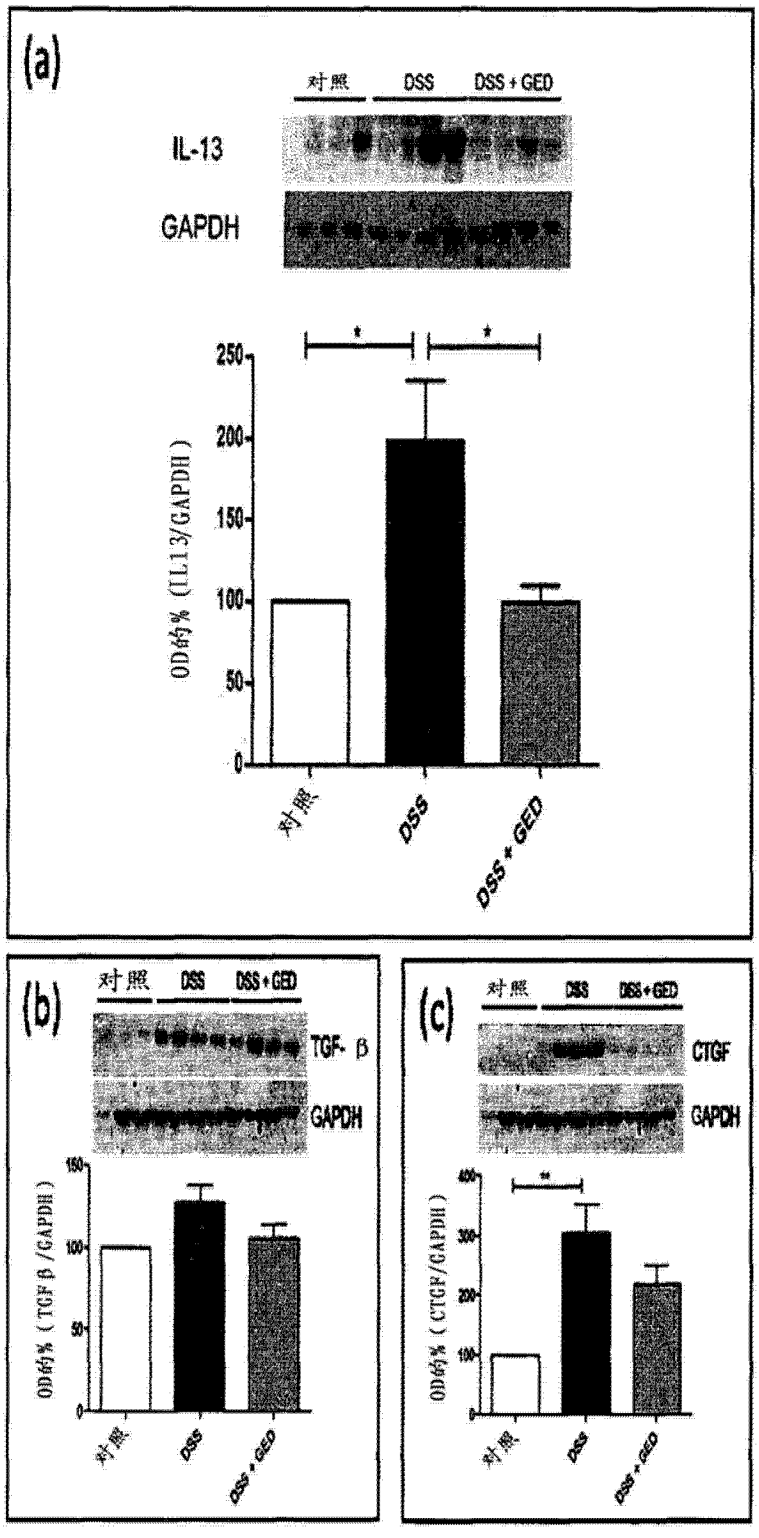

(a)
对照
DSS
DSS + GED
IL-13
GAPDH
OD的% (IL13/GAPDH)
250
200
150
100
50
0
对照
DSS
DSS + GED
(b)
对照
DSS
DSS+GED
TGF- β
GAPDH
OD的% (TGF β /GAPDH)
150
100
50
0
对照
DSS
DSS + GED
(c)
对照
DSS
DSS+GED
CTGF
GAPDH
OD的% (CTGF/GAPDH)
400
300
200
100
0
对照
DSS
DSS + GED

图 16