



(10) 授权公告号 CN 105682653 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 21

(21) 申请号 201480059363.0

(22) 申请日 2014.08.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105682653 A

(43) 申请公布日 2016.06.15

(30) 优先权数据
61/872,294 2013.08.30 US
61/919,003 2013.12.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/053406 2014.08.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/031756 EN 2015.03.05

(73) 专利权人 耶鲁大学
地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 G·I·舒尔曼 R·J·佩里

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 张全信 尚晓芹

(51) Int.Cl.
A61K 31/06 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61K 9/22 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 99/55774 A,1999.11.04
US 5851546 A,1998.12.22
Sean Marrache et al..Engineering of
blended nanoparticle platform for
delivery of mitochondria-acting
therapeutics.《PNAS》.2012,第109卷(第40期),
16288-16293.
Sean Marrache et al..Engineering of
blended nanoparticle platform for
delivery of mitochondria-acting
therapeutics.《PNAS》.2012,第109卷(第40期),
16288-16293.

审查员 崔义文

权利要求书3页 说明书33页 附图52页

(54) 发明名称

2,4-二硝基苯酚制剂和使用其的方法

(57) 摘要

本发明包括2,4-二硝基苯酚(DNP)的低剂量和缓释制剂。本发明的组合物用于预防或治疗需要其的对象中的疾病或紊乱,比如非酒精性脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎、胰岛素抗性和/或糖尿病。

1. 治疗有效量的药物组合物在制备用于预防或治疗需要其的对象中的疾病或紊乱的药物中的应用,所述药物组合物包括化合物2,4-二硝基苯酚(DNP)或其盐,

其中所述组合物在所述对象中提供所述化合物的缓释并且给予所述对象中0.05 μ M至200 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度,

其中所述组合物包括缓释包衣,所述缓释包衣包含:

- 1) 羟丙基纤维素(HPC);和
- 2) 乙基纤维素(EC);

其中所述疾病或紊乱是选自以下的至少一种:非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪肝、2型糖尿病(T2D)、获得性脂肪代谢障碍、遗传性脂肪代谢障碍、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别(ROS)有关的代谢疾病、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌,

其中所述组合物的应用不引起所述对象中显著的全身毒性或体温的显著增加,并且其中所述组合物被配制用于口服施用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中所述化合物的所述治疗有效量的范围为从1mg/kg/天到10mg/kg/天。

3. 根据权利要求1所述的应用,其中所述组合物给予所述对象中0.5 μ M到50 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度。

4. 根据权利要求3所述的应用,其中所述组合物给予所述对象中3 μ M到5 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度。

5. 根据权利要求1所述的应用,其中所述对象中所述化合物的所述稳态血浆浓度比所述对象中所述化合物的毒性浓度低50到100倍。

6. 根据权利要求1所述的应用,其中所述组合物给予所述对象中所述化合物的治疗有效水平持续12小时到24小时范围内的时间段。

7. 根据权利要求1所述的应用,其中施用所述组合物给所述对象每天一次、两次或三次。

8. 根据权利要求1所述的应用,其中所述显著的全身毒性由与不施用所述组合物的所述对象中相应水平相比,肝酶、血液尿素氮或肌酸酐的水平的增加所指示。

9. 根据权利要求1所述的应用,其中所述组合物进一步包括至少一种另外的治疗剂。

10. 根据权利要求9所述的应用,其中所述化合物和所述至少一种另外的治疗剂被共同配制在所述组合物中。

11. 根据权利要求1所述的应用,其中所述对象是哺乳动物。

12. 根据权利要求11所述的应用,其中所述哺乳动物是人。

13. 治疗有效量的药物组合物在制备用于增加需要其的对象中的能量消耗的药物中的应用,所述药物组合物包括化合物2,4-二硝基苯酚(DNP)或其盐,

其中所述组合物在所述对象中提供所述化合物的缓释并且给予所述对象中0.05 μ M至200 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度,

其中所述组合物包括缓释包衣,所述缓释包衣包含:

- 1) 羟丙基纤维素(HPC);和
- 2) 乙基纤维素(EC);

其中所述组合物的应用不引起所述对象中显著的全身毒性或体温的显著增加,并且其中所述组合物被配制用于口服施用。

14. 根据权利要求13所述的应用,其中所述对象患有选自以下的至少一种疾病或紊乱:非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、脂肪肝、2型糖尿病 (T2D)、获得性脂肪代谢障碍、遗传性脂肪代谢障碍、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别 (ROS) 有关的代谢疾病、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。

15. 根据权利要求13所述的应用,其中所述化合物的所述治疗有效量的范围为从1mg/kg/天到10mg/kg/天。

16. 根据权利要求13所述的应用,其中所述组合物给予所述对象中0.5 μ M到50 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度。

17. 根据权利要求16所述的应用,其中所述组合物给予所述对象中3 μ M到5 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度。

18. 根据权利要求13所述的应用,其中所述组合物给予所述对象中所述化合物的治疗有效水平持续12小时到24小时范围内的时间段。

19. 根据权利要求13所述的应用,其中给所述对象施用所述组合物每天一次、两次或三次。

20. 根据权利要求13所述的应用,其中所述显著的全身毒性由与不施用所述组合物的所述对象中相应水平相比,肝酶、血液尿素氮或肌酸酐的水平增加所指示。

21. 根据权利要求13所述的应用,其中所述组合物进一步包括至少一种另外的治疗剂。

22. 根据权利要求13所述的应用,其中所述对象是哺乳动物。

23. 根据权利要求22所述的应用,其中所述对象是人。

24. 被配制用于口服施用的药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的化合物2, 4-二硝基苯酚 (DNP) 或其盐,

其中所述化合物存在于缓释制剂中,

其中所述组合物包括缓释包衣,所述缓释包衣包含:

1) 羟丙基纤维素 (HPC); 和

2) 乙基纤维素 (EC);

其中所述组合物给予所述对象中0.05 μ M至200 μ M的范围的所述化合物的稳态血浆浓度,并且

其中所述组合物的应用不引起所述对象中显著的全身毒性或体温的显著增加。

25. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述量的所述组合物给予所述对象中0.5 μ M到50 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度。

26. 根据权利要求25所述的药物组合物,其中所述量的所述组合物给予所述对象中3 μ M到5 μ M范围的所述化合物的稳态血浆浓度。

27. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述对象中所述化合物的所述稳态血浆浓度比所述对象中所述化合物的毒性浓度低50到100倍。

28. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述量的所述组合物给予所述对象中所述化合物的治疗有效水平持续12小时到24小时范围的时间段。

29. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中施用所述组合物给所述对象每天一次、两次或三次。

30. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述显著的全身毒性由与不施用所述组合物的所述对象中相应水平相比,肝酶、血液尿素氮或肌酸酐的水平增加所指示。

31. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括至少一种另外的治疗剂。

32. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述包衣进一步包括选自滑石和癸二酸二丁酯中的至少一种。

33. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述组合物是珠或球体形式。

34. 根据权利要求33所述的药物组合物,其中包含所述化合物的所述珠或球体进一步包括选自甘露醇、微晶纤维素和羟丙基甲基纤维素中的至少一种。

35. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述对象是哺乳动物。

36. 根据权利要求35所述的药物组合物,其中所述哺乳动物是人。

2,4-二硝基苯酚制剂和使用其的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请依照35 U.S.C. §119(e) 要求2013年12月20日提交的美国临时专利申请号61/919,003和2013年8月30日提交的美国临时专利申请号61/872,294的优先权,其均在此通过引用以其全部并入本文。

[0003] 关于联邦政府赞助的研究或开发的声明

[0004] 本发明利用由美国国立卫生研究院授予的DK085638、DK040936和DK049230下的政府支持完成。政府在本发明中享有某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是2型糖尿病 (T2D) 的发病机制中的关键因素并且影响了1/3的美国人 (Shulman, 2000, J. Clin. Invest. 106:171-176; Petersen等, 2005, Diabetes 54:603-608; Samuel&Shulman, 2012, Cell 148:852-857; Boyle等, 2010, Popul. Health. Metr. 8:29)。NAFLD也是非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬化和肝细胞癌发展的关键诱发因素。进一步地,在美国,NAFLD诱发的NASH可能很快超过C型肝炎和酒精性肝硬化成为肝移植的最普遍的适应症 (Sanyal等, 2010, Oncologist 15Suppl. 4:14-22; Stickel& Hellerbrand, 2010, Gut 59:1303-1307; Barry等, 2010, J. Hepatol. 56:1384-1391; White等, 2012, Clin. Gastroenterol. Hepatol. 10:1342-1359)。因此,迫切需要用于治疗NAFLD的新的和有效的疗法。

[0007] 一种最有特点的线粒体解偶联剂是2,4-二硝基苯酚 (DNP), 其是使质子穿梭穿过线粒体膜——分散线粒体质子梯度并促进源自线粒体基质氧化的能量的散热的——的质子载体。在 1930年代, DNP广泛地用作体重减轻药物,但是由于发生致命的体温过高,其在1938年被美国食品和药物管理局撤出市场 (Tainter等, 1934, Am. J. Public Health Nations Health 24:1045-1053)。

[0008] 在本领域中存在对用于治疗NAFLD以及其它疾病和紊乱的组合物的需要。本发明解决了这个未满足的需要。

发明内容

[0009] 本发明提供了预防或治疗需要其的对象中的疾病或紊乱的方法。本发明进一步提供了增加需要其的对象中的能量消耗的方法。本发明进一步提供了治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包括选自2,4-二硝基苯酚 (DNP)、其盐、其溶剂化物、和其任意组合的化合物,其中所述化合物在缓释制剂中。

[0010] 在某些实施方式中,方法包括向对象施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包括选自DNP、其盐、其溶剂化物、和其任意组合的化合物。

[0011] 在某些实施方式中,疾病或紊乱是选自以下的至少一种:非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、脂肪肝、2型糖尿病 (T2D)、获得性脂肪代谢障碍、遗传性脂肪代谢障碍、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、雷特综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别 (ROS) 有关的代谢疾病、弗里德赖希氏

共济失调、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。

[0012] 在某些实施方式中,对象患有选自以下的至少一种疾病或紊乱:NAFLD、NASH、脂肪肝、T2D、获得性脂肪代谢障碍、遗传性脂肪代谢障碍、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、雷特综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的ROS 有关的代谢疾病、弗里德赖希氏共济失调、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。

[0013] 在某些实施方式中,化合物的治疗有效剂量的范围从大约1mg/kg/天到大约10mg/kg/天。在其它实施方式中,组合物的施用给予对象中从大约0.05 μ M到大约200 μ M的范围内的化合物的稳态血浆浓度。在又其它实施方式中,组合物的施用给予对象中从大约0.5 μ M到大约50 μ M的范围内的化合物的稳态血浆浓度。在又其它实施方式中,组合物的施用给予对象中从大约3 μ M到大约5 μ M的范围内的化合物的稳态血浆浓度。

[0014] 在某些实施方式中,对象中化合物的稳态血浆浓度比对象中化合物的毒性浓度低大约 50到大约100倍。在其它实施方式中,组合物的施用给予对象中治疗有效水平的化合物持续从大约12小时到大约24小时范围内的时间段。

[0015] 在某些实施方式中,每天向对象施用组合物一次、两次或三次。在其它实施方式中,组合物的施用不引起对象中显著的全身毒性或体温的显著增加。在又其它实施方式中,显著的全身毒性由肝酶、血液尿素氮或肌酸酐水平的增加——与不施用组合物的对象中相应的水平相比——指示。在又其它实施方式中,配制组合物用于口服施用。

[0016] 在某些实施方式中,对象进一步施用至少一种额外的治疗剂。在其它实施方式中,组合物和至少一种额外的治疗剂被共施用至对象。在又其它实施方式中,组合物和至少一种额外的治疗剂被共同配制。

[0017] 在某些实施方式中,对象是哺乳动物。在其它实施方式中,哺乳动物是人。

[0018] 在某些实施方式中,施用至对象的组合物的量给予对象中从大约0.05 μ M到大约200 μ M的范围内的化合物的稳态血浆浓度。在其它实施方式中,施用至对象的组合物的量给予对象中从大约0.5 μ M到大约50 μ M的范围内的化合物的稳态血浆浓度。在又其它实施方式中,施用至对象的组合物的量给予对象中从大约3 μ M到大约5 μ M的范围内的化合物的稳态血浆浓度。在又其它些实施方式中,对象中化合物的稳态血浆浓度比对象中化合物的毒性浓度低大约50到大约100倍。在又其它实施方式中,施用的组合物的量给予对象中治疗有效水平的化合物持续从大约12小时到大约24小时范围内的时间段。在又其它实施方式中,每天向对象施用组合物的量一次、两次或三次。

[0019] 在某些实施方式中,施用的组合物的量不引起对象中显著的全身毒性或体温的显著增加。在其它实施方式中,显著的全身毒性由肝酶、血液尿素氮或肌酸酐水平的增加——与不施用组合物的对象中相应的水平相比——指示。在又其它实施方式中,配制组合物用于口服施用。在又其它实施方式中,组合物进一步包括至少一种额外的治疗剂。

[0020] 在某些实施方式中,组合物中的化合物用包衣包被,所述包衣包括选自羟丙基纤维素和乙基纤维素中的至少一种。在其它实施方式中,包衣进一步包括选自滑石和癸二酸二丁酯中的至少一种。在又其它实施方式中,化合物是珠或球的形式。在又其它实施方式中,包含化合物的珠或球进一步包括选自甘露醇、微晶纤维素和羟丙基甲基纤维素中的至少一种。

附图说明

[0021] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明的具体实施方式的下面的详细描述。出于说明本发明的目的,附图中示出了具体的实施方式。然而,应当理解,本发明不限于附图中示出的实施方式的精确布置和机构。

[0022] 图1图解了2,4-二硝基苯酚(DNP)的结构。

[0023] 图2,包括图2A-2H,图解了以下发现:在NAFLD和全身胰岛素抗性的大鼠模型中,低剂量胃内输注DNP降低了血糖、甘油三酯和胰岛素浓度,以及脂肪肝和全身胰岛素抗性。图2A是图解血浆、肝脏和四头肌DNP浓度的图。图2B是图解肝脏甘油三酯含量的图。图2C是图解肌肉甘油三酯含量的图。图2D是图解肝脏二酰基甘油含量的图。图2E是图解肌肉二酰基甘油含量的图。图2F是图解空腹血糖浓度的图。图2G是图解空腹血浆甘油三酯浓度的图。图2H是图解空腹血浆胰岛素浓度的图。 $n=3-4$ 每组。

[0024] 图3是图解在时间0时饲喂大鼠花生酱中的延长释放DNP(ERDNP)(1mg/kg)之后血浆DNP浓度的图。用ERDNP治疗实现了至少12小时的3-8 μ M之间的DNP的持续血浆浓度。

[0025] 图4,包括图4A-4D,图解了以下发现:ERDNP与DNP相比具有500倍更宽的有效剂量与安全剂量的比。图4A-4B:用DNP或ERDNP急性治疗的大鼠的直肠温度。图4C-4D:用DNP或ERDNP治疗5天的高脂饲养大鼠中的肝脏三酰基甘油浓度。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 对载体治疗的组。 $n=3$ 每剂量,每组。

[0026] 图5,包括图5A-5F,图解了以下发现:ERDNP比DNP具有更好的耐受性,因为它引起更低的血浆和组织DNP浓度。图5A:DNP(25mg/kg,中毒剂量;黑圆圈)或ERDNP(1mg/kg;红正方形)的剂量之后的血浆浓度。图5B:用25mg/kg DNP治疗之后1小时的组织DNP浓度。图5C-5D:1天或5天1mg/kg ERDNP的日剂量之后的组织DNP浓度。图5E:用1mg/kg ERDNP每日治疗6周之后的组织DNP浓度。图5F:ERDNP治疗之后24小时的组织DNP浓度。在所有的实验组(panel)中, $n=3$ 每组。

[0027] 图6,包括6A-6G,图解了以下发现:ERDNP(1mg/kg每天持续5天)逆转NAFLD并提高了高脂饲养Sprague-Dawley大鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性。图6A-6C:空腹血糖、甘油三酯和胰岛素浓度。图6D:血浆胆固醇浓度。图6E-6F:IP葡萄糖耐量测试期间的血糖和胰岛素浓度。图6G:空腹血浆非酯化脂肪酸浓度。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。在所有实验组中, $n=6-8$ 每组。

[0028] 图7,包括图7A-7D,图解了以下发现:ERDNP(1mg/kg每天持续5天)提高了高脂饲养大鼠的胰岛素敏感性。图7A:维持高胰岛素-正常血糖钳夹(hyperinsulinemic-euglycemic clamp)中的血糖正常的葡萄糖输注速率。图7B:四头肌中胰岛素刺激的葡萄糖摄取。图7C:基础的(实心条)和胰岛素刺激的(虚线条)肝葡萄糖生成。图7D:肝葡萄糖生成的胰岛素刺激的抑制。在所有实验组中, $n=6-8$ 每组。

[0029] 图8,包括图8A-8F,图解了以下发现:ERDNP(1mg/kg每天持续5天)降低了高脂饲养大鼠的肝葡萄糖异生。图8A-8B:肝脏和四头肌三酰基甘油。图8C:肝脏丙酮酸羧化酶通量。图8D:肝脏乙酰辅酶A浓度。图8E:来自脂肪酸氧化(实心条)的碳和通过PDH通量(虚线条)供应的肝的三羧酸循环(TCA)循环通量。图8F:肝的甘油三酯输出。 $n=6$ 每组。

[0030] 图9,包括图9A-9H,图解了以下发现:口服ERDNP(1mg/kg每天持续14天)逆转NAFLD并提高了Zucker Diabetic Fatty大鼠的葡萄糖耐量。图9A:载体治疗的(黑圆圈)和ERDNP

治疗的大鼠(红正方形)的随机血糖浓度。图9B-9D:空腹血糖、甘油三酯和胰岛素浓度。图9E-9F:腹膜内葡萄糖耐量测试期间的葡萄糖和胰岛素浓度。图9G-9H:ALT和AST浓度。图9I:肝脏组织学(苏木精&伊红染色)。在所有实验组中,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。 $n = 6-7$ 每组。

[0031] 图10是图解空腹血糖的图。大鼠禁食6小时。ERDNP口服给药(1mg/kg每12小时)持续5天导致胰岛素抗性和NAFLD的高脂饲养大鼠模型中空腹血糖浓度的显著降低。

[0032] 图11,包括图11A-11B,图解了用载体或ERDNP治疗之后的组织TAG含量。图11A是图解肝脏TAG含量的图。图11B是图解四头肌TAG含量的图。大鼠禁食6小时。ERDNP口服给药(1mg/kg每12小时)持续5天导致胰岛素抗性和NAFLD的高脂饲养大鼠模型中肝脏甘油三酯浓度的显著降低和肌肉甘油三酯含量降低的强烈趋势。

[0033] 图12是图解单日给药延长释放DNP(ERDNP)持续5天如何显示降低血浆胰岛素浓度的强烈趋势的图。用1mg/kg ERDNP或载体治疗大鼠,每天一次持续5天。处死之前,大鼠禁食6小时。

[0034] 图13是图解单日给药延长释放DNP(ERDNP)持续5天如何导致HOMA-IR的显著降低的图。HOMA-IR的这样的降低表明,单日给药ERDNP降低了胰岛素抗性的高脂啮齿动物模型的全身胰岛素抗性。

[0035] 图14,包括图14A-14L,图解了以下发现:慢性的、胃内DNP输注(2mg/kg每天)安全地逆转了大鼠的NAFLD。图14A-14B:肝脏和四头肌二酰基甘油。图14C-14D:肝脏和四头肌DAG类别。图14E-14F:肝脏和四头肌神经酰胺。图14G-14J:ALT、AST、BUN、和肌酸酐浓度。图14K:治疗之前和之后的体重。图14L:治疗周期期间的日常热量摄取。 $n = 4$ 每组。

[0036] 图15,包括图15A-15H,图解了以下发现:ERDNP与DNP相比具有500倍更宽的有效剂量与安全剂量的比。图15A-15B:用不同剂量的DNP或ERDNP治疗5天的大鼠的ALT。图15C-15D:用不同剂量的DNP或ERDNP治疗5天的大鼠的AST。图15E-15F:用不同剂量的DNP或ERDNP治疗5天的大鼠的BUN。图15G-15H:用不同剂量的DNP治疗5天的两周龄的高脂饲养大鼠的肌酸酐。 $n = 3$ 每剂量,每组。

[0037] 图16,包括图16A-16H,图解了以下发现:六周的ERDNP治疗(1mg/kg每天)在大鼠中是良好耐受的。图16A-16D:ALT、AST、BUN和肌酸酐。图16E-16F:分别用苏木精和伊红染色的肝脏和肾脏的代表性图像。图16G:直肠温度。图16H:最后剂量的ERDNP之后8小时的组织DNP浓度。在所有实验组中, $n = 3-6$ 每组。

[0038] 图17,包括图17A-17K,图解了以下发现:ERDNP(1mg/kg每天持续5天)逆转NAFLD并提高了高脂饲养Sprague-Dawley大鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性。图17A:治疗周期末的体重。图17B:非酯化游离脂肪酸浓度。图17C:蛋白质印迹。图17D-17F:丙酮酸羧化酶、葡萄糖-6-磷酸酶和果糖-1,6-二磷酸酶蛋白。图17G-17H:IP葡萄糖耐量测试中曲线下的血糖和胰岛素面积。在所有实验组中, $n = 6-8$ 每组。图17I:脂肪氧化与TCA循环通量的比。黑条,载体;红/灰条,ERDNP。图17J:白色脂肪组织重量。图17K:血浆胆固醇。黑条,载体;红/灰条,ERDNP。

[0039] 图18,包括图18A-18Z,图解了以下发现:ERDNP(1mg/kg每天持续5天)改善NAFLD并提高了高脂饲养大鼠的胰岛素敏感性。图18A:120min高胰岛素-正常血糖钳夹结束时的血浆胰岛素浓度。图18B:贯穿钳夹的血糖浓度。图18C:钳夹期间的葡萄糖输注速率。图

18D-18E:肝脏和四头肌DAG类别。图18F-18G:肝脏PKC ϵ 和四头肌PKC θ 易位。图18H-18J:肝脏酰基肉碱浓度。图18K-18M:四头肌酰基肉碱浓度。图18N-18O:肝脏和四头肌神经酰胺浓度。图18P:肝糖原含量。图18Q:血浆炎性细胞因子浓度。 $n=3$ 每组。图18R-18S:血浆脂联素和FGF-21浓度。图18T:四头肌中胰岛素刺激的葡萄糖摄取。图18U-18V:肝脏和四头肌DAG含量。图18X:囊内棕色脂肪组织质量。图18Y:标准化为肌动蛋白的BAT UCP1 mRNA表达。图18Z:棕色脂肪组织中胰岛素-刺激的葡萄糖摄取。除非另有说明, $n=6-8$ 每组。

[0040] 图19,包括图19A-19L,图解了以下发现:ERDNP (1mg/kg每天持续14天) 逆转NAFLD并提高了Zucker Diabetic Fatty大鼠的葡萄糖耐量。图19A:用载体(黑条)或ERDNP(红条)治疗之前和之后的体重。图19B-19C:IP葡萄糖耐量测试中曲线下的葡萄糖和胰岛素面积。图19D-19E:肝脏和四头肌TAG浓度。图19F-19I:ALT、AST、BUN和肌酸酐浓度。图19J-19K:肝脏乙酰和丙二酰辅酶A浓度。图19L:肝的乙酰辅酶A浓度。在所有实验组中, $n=6-7$ 每组。

[0041] 图20,包括图20A-20L,图解了以下发现:口服ERDNP (1mg/kg每天) 改善了NASH并提高了缺乏甲硫氨酸/胆碱的大鼠的肝合成功能。图20A:肝脏甘油三酯含量。图20B-20C:血浆AST和ALT浓度。图20D:肝脏炎性细胞因子浓度,标准化为总蛋白质。 $n=4$ 每组。图20E:肝脏组织学。图20F:纤维化评分。图20G:肝脏胶原蛋白mRNA表达。图20H:肝脏平滑肌肌动蛋白。图20I:肝的羟脯氨酸含量。图20J-20K:肝脏胱天蛋白酶3和胱天蛋白酶9蛋白。图20L:血浆白蛋白浓度。除非另有说明, $n=6-8$ 每组。

[0042] 图21,包括图21-21L,图解了以下发现:ERDNP与DNP相比具有更好的耐受性,因为它导致更低血浆和组织DNP浓度。图21A-21B:在时间0时1mg/kg (图21A) 或25mg/kg (图21B) DNP之后的血浆DNP浓度。 $n=3-4$ 。图21C-21D:在时间0时1mg/kg (图21C) 或25 mg/kg (图21D) REDNP之后的血浆DNP浓度。 $n=6-9$ 。图21E:用1mg/kg口服DNP ($n=4$) 或 ERDNP ($n=9$) 治疗之后的血浆DNP浓度的曲线下的24小时面积。图21F:用10-50mg/kg DNP 治疗的大鼠的直肠温度和血浆DNP浓度之间的关联。图21G:用25mg/kg DNP治疗之后1 小时的组织DNP浓度。 $n=3$ 。图21H:一剂量的1mg/kg口服施用的ERDNP之后8小时的组织 DNP浓度。 $n=3$ 。图21I:1mg/kg口服的ERDNP之后不同时间点处的血浆:组织DNP比率。 $n=3$ 。图21J:5天的每日1mg/kg ERDNP剂量的最后一天之后8小时的组织DNP浓度。 $n=3$ 。图21K:给药之后8小时测量的口服的ERDNP剂量和组织DNP浓度之间的线性相关。 $n=3$ 。图21L:5天的每日1mg/kg ERDNP剂量的第一天和最后一天之后的血浆DNP浓度。初次治疗大鼠的数据从图21C复制。对于长期治疗的大鼠, $n=4$ 。

[0043] 图22,包括图22A-22F,图解了以下发现:两周的每日ERDNP治疗(1mg/kg) 预防了同时高脂饮食饲养的大鼠的NAFLD和胰岛素抗性。图22A-22C:空腹血糖、NEFA和胰岛素浓度。图22D-22F:肝脏、血浆和四头肌甘油三酯含量。 $n=8$ 每组。

[0044] 图23,包括图23A-23H,图解了以下发现:ERDNP不引起小鼠代谢笼分析 (metabolic cage analysis) 中测量的任何参数的任何生理学上显著的差异。图23A:耗氧量(V_{O_2})。图23B:二氧化碳生成(V_{CO_2})。图23C:呼吸商。图23D:该天的过程内的活性。图23E:贯穿该天的能量消耗。图23F:每天总的饮水。图23G:每天总的食物摄取。图23H:该天的过程内的食物摄取。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。 $n=8$ 每天。

[0045] 图24,包括图24A-24E,图解了以下发现:六周的每日ERDNP治疗(1mg/kg每天) 改善了缺乏甲硫氨酸/胆碱的大鼠的NASH并提高了肝脏合成功能。图24A:肝脏炎性细胞因子蛋

白含量,标准化为总蛋白质。图24B:肝的CD69蛋白。图24C:TUNEL阳性细胞染色的肝脏(棕色染色)。图24D:空腹血糖浓度。图24E:肝糖原含量。 $n=6-8$ 每组。

具体实施方式

[0046] 本发明涉及以下出人意料的发现:低的、持续剂量的2,4-二硝基苯酚(DNP)、或其盐或其溶剂化物、或其任意组合提供了脂肪肝的降低、提高的胰岛素敏感性、提高的葡萄糖耐量、降低的血糖和/或肝炎症的逆转,而不引起体温过高和全身毒性。

[0047] 在某些实施方式中,本发明的组合物在治疗或预防选自以下的至少一种疾病或紊乱中是有用的:非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪肝、2型糖尿病(T2D)、获得性脂肪代谢障碍、(遗传性)脂肪代谢障碍、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、雷特综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别(ROS)有关的代谢疾病、弗里德赖希氏共济失调、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。在其它实施方式中,本发明的组合物在管理、维持、和/或预防对象体重的增加中是有用的。在又其它实施方式中,本发明的组合物在降低对象的体重中是有用的。

[0048] 在一方面,本文描述的研究表明,线粒体质子载体(比如DNP)的全身毒性可由其通过改变其药代动力学来促进肝的线粒体解偶联和增加肝的脂肪氧化的能力离解。本文描述的发现不应当被解释为限于2,4-DNP的延长释放制剂,而是适用于任何已知的和有用的线粒体质子载体或其类似物/衍生物的延长释放制剂,比如,但不限于2,4-DNP(例如, β -2,4-DNP 和2,6-二硝基苯酚)、羰基氰化物间氯苯腙(CCCP)和羰基氰对三氟甲氧基苯腙(FCCP)的任何异构体和/或类似物。

[0049] 如本文所描述,DNP(ERDNP)的新型延长释放口服制剂对脂肪肝、胰岛素抗性和糖尿病的安全性和功效在NAFLD和T2D的大鼠模型中研究。这样的模型实现了DNP的持续血浆浓度(24小时内1到10 μ M),其与DNP的毒性阈值相比低50-100倍。在非限制性实施方式中,发现低浓度的DNP(1-5 μ M)促进肝的线粒体解偶联的细微增加,同时保持远低于DNP的毒性血浆阈值($\sim 400\mu$ M)。

[0050] 发现ERDNP具有比DNP高500倍的治疗指数。长期的ERDNP治疗降低了NAFLD和T2D的大鼠模型中的高三酸甘油血症、脂肪肝、胰岛素抗性和糖尿病。进一步地,ERDNP 使血浆转氨酶浓度标准化,改善肝纤维化,并提高了肝蛋白合成功能,如通过NASH的甲硫氨酸/胆碱缺陷的大鼠模型中血浆白蛋白浓度的增加所反映的。进一步地,长期的ERDNP 具有良好的耐受性并且与全身毒性无关。这些数据表明,ERDNP可用于治疗T2D、NASH、肝纤维化和代谢综合征的相关的流行病。

[0051] 定义

[0052] 除非另有限定,本文所使用的所有的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的相同的意思。虽然与本文所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,但是描述了优选的方法和材料。

[0053] 如本文所使用,下面的每个术语具有在该部分中与其相关的意思。

[0054] 冠词“一(a)”和“一个(an)”在本文中用于指冠词的一个或多于一个(即,至少一个)语法对象。举例而言,“一个要素”意思是一个要素或多于一个要素。

[0055] 术语“异常的”,当在本文中用于生物体、组织、细胞或其组成的背景下时,指的是

在至少一种可观察的或可检测的特征(例如,年龄、治疗、天数时间等)上与显示“正常的”(预期的)各自的特征的那些生物体、组织、细胞或其组成不同的那些生物体、组织、细胞或其组成。对于一种细胞或组织类型是正常或预期的特征可能对于不同的细胞或组织类型是异常的。

[0056] 如本文所使用,术语“大约”,当提及可测值比如量、时间段等时,意思是包含给定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选地 $\pm 5\%$ 、甚至更优选地 $\pm 1\%$ 、并且仍更优选的 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化适合于执行所公开的方法。

[0057] 如果疾病或紊乱的症状的严重度、患者经历这样的症状的频率、或二者降低,则疾病或紊乱被“减轻”或“治疗”。

[0058] 如本文所使用,术语“ALT”指的是丙氨酸转氨酶。

[0059] 如本文所使用,术语“AST”指的是天冬氨酸转氨酶。

[0060] 如本文所使用,术语“BUN”指的是血液尿素氮。

[0061] 如本文所使用,术语“组合物”或“药物组合物”指的是在本发明内有用的至少一种化合物与药学上可接受的载体的混合物。药物组合物促进施用化合物至患者。本领域中存在施用化合物的多种技术,包括但不限于,静脉内、口服、气溶胶、吸入、直肠、阴道、经皮、鼻内、口腔、舌下、肠胃外、鞘内、灌胃、眼、肺和局部施用。

[0062] 如本文所使用,术语“CRMP”指的是线粒体质子载体的控释口服制剂。如本文所使用,术语“ERDNP”和“CRMP”可互换地使用。

[0063] 如本文所使用,术语“DAG”指的是二酰基甘油。

[0064] “疾病”是动物的健康状况,其中动物不能维持体内平衡,并且其中如果疾病不减轻,则动物的健康继续恶化。

[0065] 相比之下,动物中的“紊乱”是其中动物能够维持体内平衡,但是其中动物的健康状况不如不存在紊乱时更有利的健康状况。如果不加以治疗,紊乱不一定引起动物健康状况的进一步降低。

[0066] 如本文所使用,术语“DNP”和“2,4-DNP”指的是2,4-二硝基苯酚、或其盐或其溶剂化物、或其任意组合(图1)。

[0067] 递送载体的“有效量”是足以有效地结合或递送化合物的量。

[0068] 如本文所使用,术语“有效量”、“药学有效量”和“治疗有效量”指的是无毒的但是提供期望的生物学结果的药剂的足够的量。所述结果可以是疾病的征兆、症状、或起因的减少和/或缓解,或生物系统的任何其它期望的改变。任何个案中适合的治疗量可由本领域普通技术人员使用常规的实验确定。

[0069] 如本文所使用,术语“功效”指的是试验中获得的最大效果(E_{\max})。

[0070] 如本文所使用,术语“ERDNP”指的是延长释放2,4-二硝基苯酚、或其盐或其溶剂化物、或其任意组合。

[0071] 如本文所使用,术语“LC/MS/MS”指的是液相色谱法/质谱分析法/质谱分析法。

[0072] 如本文所使用,术语“NAFLD”指的是非酒精性脂肪性肝病。

[0073] 如本文所使用,术语“NMR”指的是核磁共振。

[0074] 如本文所使用,术语“患者”、“个体”或“对象”指的是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括,例如,家畜和宠物,比如,羊、牛、猪科、犬科、猫科和鼠科哺乳动物。优选地,患者、

个体或对象是人。

[0075] 如本文所使用,术语“PC”指的是丙酮酸羧化酶。

[0076] 如本文所使用,术语“药学上可接受的”指的是材料,比如载体或稀释剂,其不废除化合物的生物学活性或性质,并且是相对无毒的,即,该材料可施用至个体而不引起不期望的生物学作用或者以有害的方式与组合物中包含的任何成分相互作用。

[0077] 如本文所使用,术语“药学上可接受的载体”指的是药学上可接受的材料、组合物或载体,比如液体或固体填充剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、稀释剂、赋形剂、增稠剂、溶剂或封装材料,其涉及在患者内携带或输送在本发明内有用的化合物或者将在本发明内有用的化合物携带或输送至患者,以使得它执行其预期功能。通常地,这样的构建体从一个器官或身体的一部分携带或输送至另一个器官或身体的另一部分。在与制剂的其它成分相容的意义上,每种载体必须是“可接受的”,包括在本发明内有用的,并且对患者无害的化合物。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖类,比如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,比如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素和其衍生物,比如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉末状的西黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,比如可可油和栓剂蜡;油,比如花生油、棉花籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;二醇,比如丙二醇;多元醇,比如丙三醇、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,比如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,比如氢氧化镁和氢氧化铝;表面活性剂;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格氏液(Ringer's solution);乙醇;磷酸盐缓冲液;和在药物制剂中采用的其它无毒的相容性物质。如本文所使用,“药学上可接受的载体”也包括与在本发明内有用的化合物的活性相容的,并且在生理学上对于患者是可接受的任何和所有的包衣、抗菌剂和抗真菌剂、以及吸收延迟剂(absorption delaying agent)等等。补充的活性化合物也可以被并入组合物。“药学上可接受的载体”可进一步包括在本发明内有用的化合物的药学上可接受的盐。可以包含在用于本发明的实践中的药物组合物的其它额外的成分在本领域中是已知的并且例如,在Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro编辑,Mack Publishing Co., 1985, Easton,PA)中描述,其通过引用并入本文。

[0078] 如本文所使用,语言“药学上可接受的盐”指的是由药学上可接受的无毒的酸和碱制备的施用的化合物的盐,所述酸和碱包括无机酸、无机碱、有机酸、有机碱、其溶剂化物、其水合物和其笼形物。适合的药学上可接受的酸加成盐可以由无机酸或由有机酸制备。无机酸的实例包括硫酸盐、硫酸氢盐、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、碳酸、硫酸和磷酸(包括磷酸氢盐和磷酸二氢盐)。适合的有机酸可选自脂肪族、脂环族、芳香族、芳脂族(araliphatic)、杂环、羧基和磺酸基类有机酸,其实例包括甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、葡萄糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖醛酸、马来酸、富马酸、丙酮酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯甲酸、氨基甲酸、4-羟基苯甲酸、苯乙酸、扁桃酸、双羟萘酸扑酸(双羟萘酸)、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、泛酸、三氟甲磺酸、2-羟乙基磺酸、对甲苯磺酸、磺胺酸、环己基氨基磺酸、硬脂酸、海藻酸、 β -羟丁酸、水杨酸、半乳糖二酸和半乳糖醛酸。适合的药学上可接受的本发明的化合物的碱加成盐包括,例如,铵盐和金属盐,包括碱金属盐、碱土金属盐和过渡金属盐,比如,例如钙盐、镁盐、钾盐、钠盐和锌盐。药学上可接受的碱加成盐也包括有机盐,其由碱性胺类比如,例如,N,N'-二苄基乙烯-二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺(N-甲葡糖胺)和普鲁卡因制成。所有这些盐可以由相应的化合物通过使

例如适合的酸或碱与该化合物反应制备。

[0079] 如本文所使用,术语“PKC ϵ ”指的是蛋白激酶C ϵ 。

[0080] 如本文所使用,术语“PKC θ ”指的是蛋白激酶C θ 。

[0081] 如本文所使用,术语“效能”指的是产生半数最大响应(ED₅₀)所需要的剂量。

[0082] 如本文所使用,术语““预防(prevent)”或“预防(prevention)”意思是如果什么都没有发生,则没有紊乱或疾病发展,或者如果已经存在紊乱或疾病的发展,则没有进一步的紊乱或疾病发展。还考虑的是个体预防与紊乱或疾病相关联的一些或所有的症状的能力。

[0083] 如本文所使用,术语对象的“体温的显著增加”指的是与对对象的有害效应——不限于疾病、身体不适、或疼痛、昏迷和死亡——相关联的体温增加。在一个非限制性实施方式中,体温的显著增加是大约0.5℃、大约1℃、大约1.5℃、大约2℃、大约2.5℃、大约3℃、大约3.5℃、大约4℃、大约4.5℃、大约5℃、大约5.5℃、大约6℃或更高的增加。在另一非限制性实施方式中,体温的显著增加持续大约5min、大约15min、大约30min、大约45 min、大约1h、大约1.5h、大约2h、大约3h、大约4h、大约5h、大约6h、大约7h、大约 8h、大约9h、大约10h、大约12h、大约14h、大约16h、大约18h、大约20h、大约22h、大约24h或更长。

[0084] 如本文所使用,术语对象的“显著的全身毒性”指的是与对对象的有害效应——不限于疾病、身体不适、或疼痛、昏迷和死亡——相关联的全身毒性。在一个非限制性实施方式中,显著的全身毒性由肝酶、血液尿素氮或肌酸酐的水平增加——与不施用组合物的对象中相应的水平相比——指示。

[0085] 如本文所使用,术语“TAG”指的是三酰基甘油。

[0086] 如本文所使用,术语“T2D”指的是2型糖尿病。

[0087] 如本文所使用,术语“TCA”指的是三羧酸循环。

[0088] “治疗性”治疗是施用给展现病理学征兆的对象的的治疗,出于减少或消除那些征兆的目的。

[0089] 如本文所使用,术语““治疗(treatment)”或“治疗(treating)”被限定为应用或施用治疗剂——即,在本发明内有用的化合物(单独或与另外的药剂组合)——至患者,或者应用或施用治疗剂至从患者分离的组织或细胞系(例如,用于诊断或体外应用),所述患者具有疾病或紊乱、疾病或紊乱的症状或者发展成疾病或紊乱的可能性,目的是治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、提高或影响疾病或紊乱、疾病或紊乱的症状或者发展成疾病或紊乱的可能性。基于从药物基因组学领域获得的知识,这样的治疗可以被特别地适定制或改变。

[0090] 如本文所使用,术语“VLDL”指的是极低密度脂蛋白。

[0091] 如本文所使用,术语“WAT”指的是白色脂肪组织。

[0092] 如本文所使用,术语“ZDF”指的是Zucker糖尿病肥胖。

[0093] 范围:遍及本公开内容,本发明的各方面可以以范围的形式呈现。应当理解,以范围形式的描述仅仅是出于便利和简洁的目的,并且不应当被解释为对本发明的范围的不可改变的限制。因此,范围的描述应当被视为已经具体地公开了所述范围内的所有可能的子范围以及单个数值。例如,从1到6的范围的描述应当被视为已经具体地公开了以下子范围:从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等,以及所述范围内的单个数值,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。不管范围的宽度如何,这都适用。

[0094] 描述

[0095] 本发明涉及以下出人意料的发现:在对象中,低的、持续剂量的DNP降低了脂肪肝、提高了胰岛素敏感性、提高了葡萄糖耐量、降低了血糖和/或逆转了肝炎症,而不引起体温过高和全身毒性。在某些实施方式中,对象是哺乳动物。在又其它实施方式中,哺乳动物是人。

[0096] 本发明部分地涉及以下出人意料的发现:显著的肝的线粒体解偶联可以通过施用非常低剂量连续输注的DNP(或者任何其它线粒体质子载体)来实现而没有任何的全身毒性,导致增加的肝的脂肪酸氧化,降低的肝的脂肪含量、和非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的大鼠模型中肝的和外周的胰岛素抗性的逆转。在现有技术研究中,DNP的毒性起因于口服DNP的药代动力学,其导致的峰值血浆浓度比实现治疗效果所需要的峰值血浆浓度高许多倍。考虑到体温过高和DNP的相关的毒性是与全身线粒体解偶联相关的目标效果的事实,DNP的缓释制剂对于促进肝的甘油三酯的代谢是有效的和安全的途径,同时避免通常伴随线粒体解偶联剂发生的体温过高和相关的全身毒性。

[0097] 在一方面,本发明考虑使用本发明的组合物和方法内的任何线粒体解偶联剂。在某些实施方式中,线粒体解偶联剂包括DNP。在又其它实施方式中,线粒体解偶联剂包括CCCP、FCCP、2,6-二硝基苯酚、或任何已知的2,4-DNP类似物/衍生物/异构体。

[0098] 如本文所证明,在连续低剂量胃内输注DNP期间实现的0.5 μ M-50 μ M之间——比如1-3 μ M之间——的持续的血浆和肝脏DNP浓度逆转了良好建立的NAFLD的高脂大鼠模型中的脂肪肝和全身胰岛素抗性。这些血浆DNP浓度比首先被检测到的DNP毒性的阈值低~100倍。基于这些结果,配制DNP的延长释放制剂,其导致在24小时时间间隔内低的持续的血浆DNP浓度,其又导致与DNP相比ERDNP的毒性剂量与有效剂量的比率的500倍的提高。

[0099] 进行ERDNP治疗的长期安全性和功效研究,长期日常ERDNP治疗在大鼠中是良好耐受的,持续长达6周而在行为、体温、食物摄取、活动或体重上没有改变。进一步地,长期ERDNP治疗与任何全身或肝/肾毒性无关,如通过肝酶、BUN或肌酐酐的不提高,或没有肝脏或肾脏组织学的有害改变所指示的。

[0100] 关于功效,长期ERDNP治疗导致肝脏TAG含量的50%的降低。肝的脂肪含量的这种降低可以归因于肝脏线粒体 V_{TCA} 循环通量的60%的增加,其完全是由于肝的脂肪氧化的70%的增加。肝脏脂质含量的这种降低与空腹血糖浓度、肝葡萄糖生成的基础率的显著降低和全身胰岛素敏感性的提高相关联。肝葡萄糖生成的基础率的这种降低可以归因于 V_{PC} 通量的25%的降低,其对乙酰辅酶A的浓度的50%的降低——PC活性的关键变构调节剂——最可能是次要的。相比之下,ERDNP治疗对肝的PEP-CK、PC或葡萄糖-6-磷酸酶蛋白表达没有作用。

[0101] 全身胰岛素敏感性的ERDNP提高又可以归因于肝和肌肉胰岛素响应性二者的增加,如通过在高胰岛素-正常血糖钳夹期间的肝葡萄糖生成的抑制的2.5倍增加和胰岛素刺激的外周葡萄糖摄取的三倍增加所反映的。这种ERDNP诱导的肝和肌肉胰岛素敏感性的增加可分别归因于肝和肌肉DAG含量,以及肝和肌肉中PKC ϵ 和PKC θ 活性的>50%的降低。DAG-nPKC活化涉及引起NAFLD的人和动物模型二者中的肝和肌肉胰岛素抗性。观察到的TAG/DAG含量的ERDNP降低可至少部分归因于肝的VLDL输出的80%的降低。不希望受任何理论的束缚,虽然ERDNP可促进骨骼肌中的线粒体解偶联,但是高20倍的DNP浓度不引起四头

肌中的显著的线粒体解偶联的事实使得这种可能性是不太可能的。

[0102] ERDNP的安全性和功效在ZDF大鼠——与NASH有关的T2D的模型——中检查。两周的ERDNP治疗导致肝脂肪含量的60%的降低和肝炎症的逆转,如通过这些动物中血浆ALT和AST的正常化所反映的,这突出了ERDNP在逆转NASH中的可能的作用。此外,ERDNP引起ZDF大鼠中空腹血糖浓度的400mg/dL的降低,其可以归因于全身胰岛素敏感性的显著提高,如通过在腹膜内葡萄糖耐量测试期间较低的血糖和胰岛素浓度所反映的。与在其它动物研究中观察到的没有全身毒性一致,ZDF大鼠的长期ERDNP治疗是良好耐受的并且不引起行为、体温、摄食行为、体重或活动的改变,并且与肾功能的任何改变无关。

[0103] 在一方面,本研究表明,通过改变DNP的药代动力学以促进低的持续的全身释放,DNP的治疗窗增加多于500倍。长期ERDNP施用逆转大鼠中的NAFLD/NASH、胰岛素抗性和2型糖尿病而没有任何全身的、肝的或肾的毒性。合起来,这些数据支持ERDNP用于治疗NAFLD/NASH、代谢综合征和2型糖尿病的相关流行病的实用性。

[0104] 本发明的组合物,其包括DNP的治疗低剂量、缓释制剂,在治疗疾病或紊乱中是有用的,所述疾病或紊乱比如但不限于非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪肝、2型糖尿病(T2D)、获得性脂肪代谢障碍、脂肪代谢障碍(遗传性)、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、雷特综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别(ROS)有关的代谢疾病、弗里德赖希氏共济失调、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。

[0105] 在某些实施方式中,本发明的组合物和方法可以用于治疗或预防疾病或紊乱,比如,但不限于,NAFLD、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪肝、获得性脂肪代谢障碍、遗传性脂肪代谢障碍、部分性脂肪代谢障碍、胰岛素抗性、2型糖尿病(T2D)、肥胖、高三酸甘油血症、代谢综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别(ROS)有关的代谢疾病、弗里德赖希氏共济失调、肝纤维化、肝硬化、肝细胞癌、其中自由基介导的氧化损伤导致组织退化的疾病、和其中细胞不适当地经历细胞凋亡的疾病,并且包括许多疾病的治疗,所述许多疾病包括但不限于自身免疫病、先天性肌营养不良症、致命的婴儿肌病、“后发性(later-onset)”肌病、MELAS(线粒体脑病变、乳酸酸中毒和中风)、MIDD(线粒体糖尿病伴随耳聋(mitochondrial diabetes and deafness))、MERRF(肌阵挛性癫痫伴肌肉破碎破坏性红肌纤维综合征)、关节炎、NARP(神经病;共济失调;色素性视网膜炎)、MNGIE(肌病和外眼肌麻痹;神经病;肠胃病;脑病变)、LHON(利伯氏遗传性视神经病(Leber's; Hereditary; Optic Neuropathy))、基-塞二氏病、皮尔逊氏综合征、PEO(进行性外眼肌麻痹)、沃尔弗拉姆综合征、DIDMOAD(尿崩症、糖尿病、视神经萎缩、耳聋)、ADPD(阿尔茨海默病;帕金森病)、AMFD(共济失调、肌阵挛和耳聋)、CIPO(慢性假肠梗阻;肌病;眼肌麻痹)、CPEO(慢性进行性外眼肌麻痹)、母系遗传性耳聋(maternally inherited deafness)、氨基糖苷类诱导的耳聋(aminoglycoside-induced deafness)、DEMCHO(痴呆;舞蹈病)、DMDF(糖尿病;耳聋)、运动耐受不良、ESOC(癫痫;中风;视神经萎缩;先天性衰退(congenitive decline))、FBSN(家族性两侧纹状体坏死(familial bilateral striatal necrosis))、FICP(致命的婴儿心肌病加MELAS相关的心肌病(fatal infantile cardiomyopathy plus a MELAS-associated cardiomyopathy))、GER(肠胃反流(gastrointestinal reflux))、LIMM(致死的婴儿线粒体肌病(lethal infantile mitochondrial myopathy))、LDYT(利伯氏遗传性视神经病和肌

张力障碍 (Leber's hereditary optic neuropathy and DYsTonia))、MDM(肌病;糖尿病)、MEPR(肌阵挛性癫痫;精神运动性退化)、MERME(MERRF/MELAS重叠病(overlap disease))、MHCM(母系遗传性肥厚型心肌病(maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy))、MICM(母系遗传性心肌病(maternally inherited cardiomyopathy))、MILS(母系遗传性利氏综合征(maternally inherited Leigh syndrome))、线粒体脑心肌病(mitochondrial encephalocardiomyopathy)、线粒体脑肌病、线粒体肌病、MMC(母性肌病(maternal myopathy);心肌病(cardio myopathy))、多系统线粒体紊乱(multisystem mitochondrial disorder)(肌病;脑病变;失明;听力损失;周围神经病变)、NIDDM(非胰岛素依赖型糖尿病)、PEM(进行性脑病变)、PME(进行性肌阵挛性癫痫(progressive myoclonus epilepsy))、雷特综合征、SIDS(婴儿猝死综合征)、SNHL(感觉神经性听力损失)、利氏综合征、肌张力障碍、精神分裂症和牛皮癣。

[0106] 在某些实施方式中,疾病或紊乱是NAFLD。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是脂肪肝。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是2型糖尿病。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是获得性脂肪代谢障碍。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是遗传性脂肪代谢障碍。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是部分性脂肪代谢障碍。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是高三酸甘油血症。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是肥胖。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是代谢综合征。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是胰岛素抗性。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是雷特综合征。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是与老化有关的代谢综合征。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是与活性氧类别(ROS)有关的代谢疾病。在又其它实施方式中,疾病或紊乱是弗里德赖希氏共济失调。在又其它实施方式中,疾病是肝纤维化。在又其它实施方式中,疾病是肝硬化。在又其它实施方式中,疾病是肝细胞癌。

[0107] 缓释和控释制剂

[0108] 在一方面,本发明提供了缓释的DNP制剂。在某些实施方式中,本发明提供了DNP的缓释制剂,包括治疗有效量的DNP或其药学上可接受的盐或溶剂化物。如本文所使用,“缓释”或“延长释放”指的是以下事实:DNP或其药学上可接受的盐从制剂中以受控的速率释放,使得在延长的时间段内维持DNP或其药学上可接受的盐的治疗上有益的血浓度(其低于毒性水平)。可选地,“缓释”或“延长释放”意思是在延长的时间段内维持期望的药理学效果。

[0109] 在一方面,本发明提供了通过降低给药的频率增强患者便利的可能性。在另一方面,较低的给药频率提供了降低的副作用,这是因为随着时间患者暴露于较低峰值浓度的药物。

[0110] 在某些实施方式中,本发明提供了口服缓释制剂。在又其它实施方式中,配制本发明的组合物用于口服缓释。但是,本发明不应当被解释为仅限于口服制剂,而是包含提供低剂量和缓释的DNP的任何形式的制剂。

[0111] 在某些实施方式中,与对于可注射的或立即释放的口服制剂观察到的相比,本发明的缓释制剂在更长的时期内提供药物的控释(例如,至少大约8-12小时)。在其它实施方式中,缓释经历的时间段可以长达1个月或更长,并且应当是比以丸剂形式施用的相同量的药剂更长的释放。在又其它实施方式中,时间段大于大约一天、大约两天、大约一周、大约两

周、大约一个月、大约两个月、和其间的任何和所有的范围。在又其它实施方式中,时间段在大约12小时和大约24小时之间。在又其它实施方式中,时间段是大约12小时。在又其它实施方式中,时间段是大约14小时。在又其它实施方式中,时间段是大约24小时。

[0112] 在某些实施方式中,缓释制剂每天施用一次。在其它实施方式中,缓释制剂每天施用两次。在又其它实施方式中,缓释制剂每天施用三次。

[0113] 在某些实施方式中,在对象中,缓释提供本发明的质子载体的稳态血浆浓度。在其它实施方式中,稳态血浆浓度的范围在大约0.05 μ M和大约200 μ M之间。在又其它实施方式中,稳态血浆浓度的范围在大约0.05 μ M和大约50 μ M之间。在又其它实施方式中,稳态血浆浓度的范围在大约0.5 μ M和大约50 μ M之间。在又其它实施方式中,峰值血浆浓度等于或低于大约400 μ M。在又其它实施方式中,峰值血浆浓度等于或低于大约300 μ M。在又其它实施方式中,峰值血浆浓度等于或低于大约30 μ M。在又其它实施方式中,稳态血浆浓度的范围在大约1 μ M和大约10 μ M之间。在又其它实施方式中,稳态血浆浓度的范围在大约1 μ M和大约5 μ M之间。在又其它实施方式中,稳态血浆浓度是大约5 μ M。在又其它实施方式中,稳态血浆浓度是大约3 μ M。

[0114] 在某些实施方式中,在对象中,缓释制剂提供本发明的化合物的组织浓度。在其它实施方式中,组织浓度等于或低于10 μ M。在又其它实施方式中,组织浓度等于或低于5 μ M。在又其它实施方式中,组织浓度等于或低于2 μ M。

[0115] 本发明的化合物或其盐可以均匀地分散在缓释递送系统中。在某些实施方式中,化合物以大约1mg到大约200mg;大约1mg到大约150mg;大约1mg到大约125mg;或大约1mg 到大约100mg的量存在于组合物中。在某些实施方式中,化合物或其药学上可接受的盐以大约2mg到大约5mg;大约5mg到大约80mg;大约10mg到大约70mg;大约15mg到大约 60mg;大约40mg到大约80mg;大约50mg到大约70mg;或大约45mg到大约60mg的量存在于组合物中。在某些实施方式中,化合物或其药学上可接受的盐以大约2mg;大约20 mg、大约40mg、大约60mg、大约75mg、大约80mg、大约100mg、大约120mg、大约140 mg、大约150mg、大约160mg、大约175mg、大约180mg或大约200mg的量存在于组合物中。

[0116] 在某些实施方式中,化合物或其药学上可接受的盐与缓释递送系统在组合物中的比通常为从大约4:1到大约1:25。在一些实施方式中,化合物或其药学上可接受的盐与缓释递送系统的比通常为从大约2.5:1到大约1:4。在一些实施方式中,化合物或其药学上可接受的盐与缓释递送系统的比通常为从大约5:1到大约1:5、大约4:1到大约1:4、大约 3:1到大约1:3、大约2:1到大约1:2、大约1:1到大约1:5、大约1:1到大约1:4、大约1:1到大约1:3、大约1:1到大约1:2、和大约1:2到大约1:3。在一些实施方式中,化合物或其药学上可接受的盐与缓释递送系统的比通常为大约1:1、大约1:2、大约1: 2.5、大约1:3、大约1:4、或大约1:5。

[0117] 对于缓释,可以利用给化合物提供缓释性质的适合的聚合物或疏水材料配制化合物。因此,化合物可以以微粒的形式例如通过注入,或者以晶片或者圆盘的形式通过植入(implantation)来施用。

[0118] 在某些实施方式中,使用缓释制剂将本发明的化合物单独或与另外的药剂组合施用至患者。

[0119] 在某些实施方式中,本发明的化合物的缓释制剂是口服可施用的固体剂型。口服

固体剂型的非限制性的实例包括片剂、包含多种颗粒剂的胶囊、舌下片剂、粉末、颗粒剂、糖浆和口腔剂型。在某些实施方式中，片剂具有肠溶衣和亲水包衣。

[0120] 在某些实施方式中，在添加本发明的化合物或其药学上可接受的盐之前，缓释递送系统由干法制粒和湿法制粒制备，但是成分可以通过附聚技术保持在一起以产生可接受的产物。在湿法制粒技术中，将成分（例如，亲水化合物、交联剂、药物稀释剂、阳离子交联化合物、疏水聚合物等）混合在一起，然后用一种或多种液体（例如，水、丙二醇、丙三醇、乙醇）湿润以产生随后被干燥的湿润的团块（mass）。然后用常规技术将干燥的团块磨碎成缓释递送系统的颗粒。其后，缓释递送系统以期望的量与本发明的化合物或其药学上可接受的盐、和任选地一种或多种湿润剂、一种或多种润滑剂、一种或多种缓冲剂、一种或多种着色剂、一种或多种第二亲水化合物、或其它的常规成分混合以产生颗粒状组合物。缓释递送系统和本发明的化合物可以用例如高剪混合器进行混合。本发明的化合物优选地精细地和均匀地分散在缓释递送系统中。足以制造统一批次的片剂的量的颗粒状组合物在常规生产规模压片机中在通常的压缩压力——即，大约2,000-16,000psi——下经历压片（tableting）。在某些实施方式中，混合物不应当被压缩至在暴露于液体之后在随后的水合作用中存在困难的程度。

[0121] 在一些实施方式中，本发明的组合物通过干法制粒或湿法制粒制备。缓释递送系统的成分连同本发明的化合物或其药学上可接受的盐一起添加。可选地，所有的成分可以通过附聚技术保持在一起以产生可接受的产物。在湿法制粒技术中，将本发明的化合物或其药学上可接受的盐以及成分（例如，亲水化合物、交联剂、药物稀释剂、阳离子交联化合物、疏水聚合物等）混合在一起，然后用一种或多种液体（例如，水、丙二醇、丙三醇、乙醇）湿润以产生随后被干燥的湿润的团块。然后用常规设备将干燥的团块磨碎成颗粒。任选地，一种或多种湿润剂、一种或多种润滑剂、一种或多种缓冲剂、一种或多种着色剂、一种或多种第二亲水化合物、或其它的常规成分也被加入到制粒中。足以制造统一批次的片剂的量的颗粒状组合物在常规生产规模压片机中在通常的压缩压力——即，大约2,000-16,000psi——下经历压片。在某些实施方式中，混合物不应当被压缩至在暴露于液体之后在随后的水合作用中存在困难的程度。

[0122] 在某些实施方式中，颗粒状组合物的平均颗粒尺寸为从大约50 μm 到大约400 μm 。在某些实施方式中，平均颗粒尺寸为从大约185 μm 到大约265 μm 。颗粒状组合物的平均密度为从大约0.3g/mL到大约0.8g/mL。在某些实施方式中，平均密度为从大约0.5g/mL到大约0.7g/mL。由制粒形成的片剂通常为从大约4Kp到大约22kP硬度。制粒的平均流量为从大约25到大约40g/秒。

[0123] 在一方面，本发明提供了多层固体剂型，其中所述层配制为以不同的速率释放本发明的化合物。例如，在某些实施方式中，第二层是延长释放层，其包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐和缓释递送系统，其被设计为以受控的速率释放本发明的化合物或其药学上可接受的盐，以便在延长的时间段（例如，从大约8到大约12小时）内维持治疗上有益的血浓度。第一层是立即释放层，其包括本发明的化合物或其药学上可接受的盐的制剂，其被设计为以比第二层的速率更快的速率释放本发明的化合物或其药学上可接受的盐从而在即刻的时间段（例如，从大约1到大约2小时）内实现治疗上有益的血浓度。在一些实施方式中，第一层包括缓释递送系统。在一些实施方式中，第一层不包括缓释递送系统。

[0124] 在一些实施方式中,第二层与第一层的重量比为大约10:1到大约1:10、大约9:1到大约1:9、大约8:1到大约1:8、大约7:1到大约1:7、大约6:1到大约1:6、大约5:1 到大约1:5、大约4:1到大约1:4、大约3:1到大约1:3、大约2:1到大约1:2。在某些实施方式中,第二层与第一层的重量比为大约5:1到大约1:5。在又其它实施方式中,第二层与第一层的重量比为大约1:1到大约1:2。在又另一实施方式中,第二层与第一层的重量比为大约1:1、大约1:1.2、大约1:1.4、大约1:1.6、大约1:1.8、或大约1:2。在某些实施方式中,第二层与第一层的重量比为大约1:2。在某些实施方式中,第二层与第一层的重量比为大约1:1.4。在一些实施方式中,第二层与第一层的重量比为大约3:1、大约2.5:1、大约2:1、大约1.5:1。在某些实施方式中第二层与第一层的重量比为大约 2.5:1。

[0125] 在一些实施方式中,多层剂型进一步包括药物崩解剂。所述崩解剂促进本发明的化合物或其药学上可接受的盐从立即释放层溶解和吸收。药物崩解剂的非限制性实例包括交联羧甲基纤维素钠、甘醇酸淀粉钠(starch glycolate)、交聚维酮、和未改性的淀粉。在某些实施方式中,崩解剂在剂型的第一层(即,立即释放层)中。在某些实施方式中,崩解剂以大约1.5mg到大约4.5mg的量存在于层中。在某些实施方式中,崩解剂以按重量计大约2-10%的量存在于层中。在某些实施方式中,崩解剂以按重量计大约5%的量存在于层中。当层包含缓释递送系统时,缓释递送系统与崩解剂的重量比在大约5:1到大约1:5的范围内。在一些实施方式中,缓释递送系统与崩解剂的重量比在大约1:1到大约3:1的范围内。在其它实施方式中,缓释递送系统与崩解剂的比的范围为大约2:1。

[0126] 在一些实施方式中,本发明的多层片剂通过首先单独制备立即释放层和延长释放层掺合物来制备。延长释放层如本文别处描述进行制备。湿法制粒的延长释放层然后被干燥并且磨碎为适合的尺寸。加入硬脂酸镁并与磨碎的颗粒混合。本发明的立即释放层通过首先将本发明的化合物或其药学上可接受的盐与一种或多种稀释剂(例如,微晶纤维素)混合来制备。该混合物然后任选地与一种或多种崩解剂混合。该掺合物与硬脂酸镁混合。最后,立即释放层掺合物和延长释放层掺合物被压缩成多层(例如,双层)片剂。

[0127] 在某些实施方式中,本发明的制剂可以是,但不限于,短期的、快速失效的(rapid-offset)、以及受控的,例如延迟释放和脉冲式释放(pulsatile release)制剂。

[0128] 术语延迟释放在本文中以其常规的意义使用,指的是这样的药物制剂:其在药物施用的一些延迟之后提供药物的最初释放,并且其包括从大约10分钟到至多大约12小时的延迟,虽然不一定。

[0129] 术语脉冲式释放在本文中以其常规的意义使用,指的是这样的药物制剂:其以在药物施用之后产生药物的脉冲的血浆曲线的方式提供药物的释放。

[0130] 术语立即释放在本文中以其常规的意义使用,指的是这样的药物制剂:其在药物施用之后提供药物的立即释放。

[0131] 如本文所使用,短期指的是药物施用之后至多并且包括大约8小时、大约7小时、大约 6小时、大约5小时、大约4小时、大约3小时、大约2小时、大约1小时、大约40分钟、大约 20分钟、或大约10分钟的任何时间段,和其任何或所有的全部或部分增量。

[0132] 如本文所使用,快速失效指的是药物施用之后至多并且包括大约8小时、大约7小时、大约6小时、大约5小时、大约4小时、大约3小时、大约2小时、大约1小时、大约40分钟、大约20分钟、或大约10分钟的任何时间段,和其任何或所有的全部或部分增量。

[0133] 方法

[0134] 本发明包括预防或治疗需要其的对象中的疾病或紊乱的方法。该方法包括给对象施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包括选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、其盐、其溶剂化物、和其任意组合的化合物,其中该组合物提供化合物在对象中的缓释,由此对象中的疾病或紊乱在对象中被治疗或预防。

[0135] 本发明进一步包括增加需要其的对象中的能量消耗的方法。该方法包括给对象施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包括选自DNP、其盐、其溶剂化物、和其任意组合的化合物,其中该组合物提供化合物在对象中的缓释,由此对象中的能量消耗增加。

[0136] 在某些实施方式中,疾病或紊乱至少选自以下的至少一种:非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪肝、2型糖尿病(T2D)、获得性脂肪代谢障碍、脂肪代谢障碍(遗传性)、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、雷特综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别(ROS)有关的代谢疾病、弗里德赖希氏共济失调、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。

[0137] 在某些实施方式中,对象患有选自以下的至少一种疾病或紊乱:非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、脂肪肝、2型糖尿病(T2D)、获得性脂肪代谢障碍、脂肪代谢障碍(遗传性)、部分性脂肪代谢障碍、高三酸甘油血症、肥胖、代谢综合征、雷特综合征、与老化有关的代谢综合征、与增加的活性氧类别(ROS)有关的代谢疾病、弗里德赖希氏共济失调、胰岛素抗性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。

[0138] 在某些实施方式中,化合物的治疗有效剂量的范围为从大约1mg/kg/天到大约10mg/kg/天。在其它实施方式中,组合物的施用给予对象中范围在从大约0.05 μ M到大约200 μ M范围内的化合物的稳态血浆浓度。在又其它实施方式中,组合物的施用给予对象中范围在从大约0.5 μ M到大约50 μ M范围内的化合物的稳态血浆浓度。在又其它实施方式中,组合物的施用给予对象中范围在从大约1 μ M到大约10 μ M范围内的化合物的稳态血浆浓度。在又其它实施方式中,组合物的施用给予对象中范围在从大约3 μ M到大约5 μ M范围内的对象中化合物的稳态血浆浓度。

[0139] 在某些实施方式中,对象中化合物的稳态血浆浓度比对象中化合物的毒性浓度低大约 50到大约100倍。

[0140] 在某些实施方式中,组合物的施用给予在对象中化合物的治疗有效水平持续大约12小时到大约24小时范围内的时间段。在某些实施方式中,每天给对象施用组合物一次、两次或三次。

[0141] 在某些实施方式中,组合物的施用不引起对象中的显著的全身毒性或体温的显著增加。在其它实施方式中,显著的全身毒性由肝酶、血液尿素氮或肌酸酐的水平增加——与不施用组合物的对象中相应的水平相比——指示。在又其它实施方式中,配制组合物用于口服施用。

[0142] 在某些实施方式中,方法进一步包括给对象对象施用至少一种额外的治疗剂。在其它实施方式中,组合物和至少一种额外的治疗剂共施用给对象。在又其它实施方式中,组合物和至少一种额外的治疗剂被共同配制。

[0143] 在某些实施方式中,对象是哺乳动物。在其它实施方式中,哺乳动物是人。

[0144] 组合法

[0145] 本发明的方法内有用的化合物可以与对于治疗疾病或紊乱有用的一种或多种额外的化合物组合使用。这些额外的化合物可包括商业可得的或对于本领域技术人员合成可得的化合物。已知这些额外的化合物治疗、预防、或降低疾病或紊乱的症状。

[0146] 在非限制性实例中,本发明内有用的化合物可以与以下疗法中的一种或多种组合使用:

[0147] 肺动脉高血压药物:安贝生坦(ambrisentan)、波生坦(bosentan)、曲前列环素(treprostinil)、西地那非(sildenafil)、依前列醇、treprostenol、伊洛前列素(iloprost)、醛固酮受体拮抗剂比如安体舒通和依普利酮(eplerenone)、血管紧张素转化酶抑制剂,比如群多普利(trandolapril)、福辛普利、依那普利、卡托普利、雷米普利(ramipril)、莫西普利(moexipril)、赖诺普利、喹那普利、苯那普利(benazepril)和哌唑普利;

[0148] 血管紧张素II抑制剂:依普沙坦(eprosartan), olmesartan, telmisartan, 洛沙坦(losartan), valsartan, 坎地沙坦(candesartan), 和 irbesartan, 抗心绞痛药剂比如硝酸甘油、单硝酸异山梨酯和硝酸异山梨酯, 抗心律不齐药剂, 包括莫雷西嗪(moricizine)、奎尼丁、达舒平、phenytoin、心律平、flecainide、mexiletine、利多卡因、普鲁卡因酰胺、心得安、醋丁酰心安(acebutolol)、胺碘酮、多非利特(dofetilide)、决奈达隆(dronedarone)、心得怡、伊布利特(ibutilide)、地尔硫卓、异搏定、硝苯地平、尼莫地平、非洛地平、尼卡地平、氯维地平(clevidipine)、伊拉地平、卡普地尔、尼索地平、腺苷、和地高辛。

[0149] β -肾上腺素能受体拮抗剂:倍他洛尔(betaxolol)、比索洛尔、美托洛尔、阿替洛尔、奈比洛尔、纳多洛尔、卡维地洛(carvedilol)、拉贝洛尔、噻吗心安、卡替洛尔、喷布洛尔、心得静、和艾司洛尔。

[0150] 抗糖尿病药剂:胰岛素、GLP-1激动剂、DPP4抑制剂、SGLT-2抑制剂、, 促分泌素比如磺酰胺类、甲苯磺丁脲、乙酰苯磺酰环己脲、, 甲磺吡啶脲、氯磺丙脲、格列吡嗪、优降糖(glyburide)、格列美脲(glimepiride)、格列本脲(glibenclamide)、格列齐特、美各里替尼(meglitinide)比如那格列奈(nateglinide)、senaglinide、瑞格列奈(repaglinide), 胰岛素敏感剂比如双胍类、二甲双胍, 噻唑烷二酮类比如罗格列酮(rosiglitazone)、isaglitazone、达格列酮(darglitazone)、恩格列酮(englitazone)和吡格列酮(pioglitazone);

[0151] α -葡萄糖肝酶抑制剂:米格列醇(miglitol)、伏格列波糖(voglibose)、乙格列酯(emigliate)和阿卡波糖;

[0152] 胰高血糖素样肽类似物和激动剂:艾塞那肽(exenatide)、利拉鲁肽(liraglutide), taspoglutide、二肽基肽酶-4抑制剂、比如维达列汀(vildagliptin)、西他列汀(sitagliptin)和沙格列汀(saxagliptin);

[0153] 糊精类似物:普兰林肽(pramlintide);

[0154] 过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)- α , β , δ , 和 γ 胆固醇-降低剂的配体或激动剂:羟甲基戊二酰-辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂样他汀类药物, 比如, 例如, 阿托伐他汀、氯伐他汀(fluvastatin)、洛伐他汀、匹伐他汀(pitavastatin)、普伐他汀、罗索伐他汀(rosuvastatin)和辛伐他汀;

[0155] 维生素A类X受体(RXR)的激动剂:ALRT-268、LG-1268或LG-1069; 葡糖激酶活化剂,

葡萄糖异生和/或糖原分解的刺激中涉及的肝酶抑制剂,

[0156] 利尿剂:乙酰唑胺、双氯非那胺(dichlorphenamide)、醋甲唑胺、托拉塞米(dichlorphenamide)、速尿灵、布美他尼、利尿酸、阿米洛利、三氮唑啉、吲达帕胺、美托拉宗、methyleclothiazide、氢氯噻嗪、氯噻嗪、美托拉宗、苄氟噻嗪、泊利噻嗪和氯噻酮;

[0157] 血管舒张药:前列地尔、胍苯哒嗪、米诺地尔、奈西利肽(nesiritide)、和硝普盐;

[0158] 抗Lipidemic药剂:消胆胺、降脂2号树脂、安妥明、吉非贝齐、普罗考布或右旋甲状腺素;

[0159] 脂肪细胞因子:瘦蛋白(leptin)、脂肪连接蛋白和美曲普汀;

[0160] 用于治疗高脂血症的药物:贝特类、 ω 脂肪酸、鱼油、他汀类药物。

[0161] 例如,可以使用适合的方法计算协同效应,所述适合的方法比如,例如,Sigmoid- E_{max} 方程(Holford&Scheiner,1981,Clin.Pharmacokinet.6:429-453)、Loewe相加方程(Loewe& Muischnek,1926,Arch.Exp.Pathol Pharmacol.114:313-326)和中效方程(Chou& Talalay, 1984,Adv.Enzyme Regul.22:27-55)。上面提及的每个方程可应用于实验数据来生成相应的图从而帮助评估药物联合的效果。与上面提及的方程相关联的相应图分别是浓度效应曲线、等效图曲线和联合指数曲线。

[0162] 施用/剂量/制剂

[0163] 施用方案可影响什么构成本发明的组合物的有效剂量。治疗剂量的本发明的组合物可以在疾病或紊乱的发生之前或之后施用给对象。进一步地,几种分开的剂量以及交错的剂量可以每天或顺序地施用,或者剂量可以被连续地输注,或者可以是快速浓注。进一步地,根据治疗或预防情形的迫切情况所指示,本发明的组合物的给药可以成比例地增加或减少。

[0164] 可以使用已知的步骤,以有效治疗患者中的疾病或紊乱的剂量和时间段,实施将本发明的组合物施用给患者,优选地哺乳动物,更优选地人。实现治疗效果所必需的本发明的组合物的有效量可以根据以下因素改变:比如患者中的疾病或紊乱的状态;患者的年龄、性别和体重;以及治疗制剂治疗患者中的疾病或紊乱的能力。可以调整本发明的组合物的给药以提供最优的治疗反应。例如,根据治疗情形的迫切情况所指示,几种分开的剂量可以每天施用,或者剂量可以成比例地减少。本发明的治疗化合物的有效剂量范围的非限制性实例是大约1到5,000mg/kg体重/每天。本领域普通技术人员将能够研究相关因素并且做出关于本发明的组合物的有效量的决定,而不进行过度的实验。

[0165] 可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平从而获得活性成分的量,该活性成分的量对于具体的患者、组合物和施用模式实现期望的治疗反应是有效的,而对于患者而言是无毒的。

[0166] 具体而言,选择的剂量水平取决于多种因素,包括采用的具体化合物的活性,施用的时间,化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与化合物组合使用的其它药物、化合物或材料,正在被治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康和先前病史等医学领域中熟知的因素。

[0167] 具有本领域普通技能的医师——比如内科医师或兽医师——可以容易地确定和开处方本发明的组合物的有效量。例如,内科医师或兽医师可以以低于为了实现期望的治疗效果所需要的的水平开始药物组合物中采用的本发明的组合物的剂量,并逐渐地增加剂

量直到实现期望的效果。

[0168] 在具体的实施方式中,尤其有利的是以剂量单位形式配制本发明的组合物,以便于施用和剂量的一致性。如本文所使用,剂量单位形式指的是对于将要被治疗的患者而言适合作为单位剂量的物理离散单位;每个单位包含预定量的治疗化合物,其被计算以与需要的药物载体一起产生期望的治疗效果。本发明的剂量单位形式由下述(a)和(b)指示并直接地依赖于下述(a)和(b):(a)治疗化合物的独特特性以及待实现的具体的治疗效果,和(b)本领域中合成/配制用于治疗患者中的疾病或紊乱的这样的治疗化合物的内在的限制。

[0169] 在某些实施方式中,使用一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体配制本发明的组合物。在某些实施方式中,本发明的制剂包括本发明的组合物和药学上可接受的载体。

[0170] 载体可以是溶剂或分散介质,例如,包括水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇、液体聚乙二醇等等)、其适合的混合物、和植物油。例如,可以通过使用包衣比如卵磷脂,通过在分散的情况下维持需要的颗粒尺寸和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。防止微生物的活动可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂实现,所述抗菌剂和抗真菌剂例如,对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等等。在许多情况下,在组合物中优选包括等渗剂,例如,糖、氯化钠、或多元醇,所述多元醇比如甘露醇和山梨醇。可注射的组合物的延长吸收可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂而引起,所述试剂例如,单硬脂酸铝或明胶。

[0171] 在某些实施方式中,本发明的组合物以每天1到5次或更多的范围内的剂量施用给患者。在又其它实施方式中,本发明的制剂以以下剂量范围施用给患者:包括,但不限于,每天一次、每两天一次、每三天一次到每周一次和每两周一次。对于本领域技术人员显而易见的是,本发明的不同组合组合物的施用频率从个体到个体改变,取决于许多因素,包括但不限于,年龄、待被治疗的疾病或紊乱、性别、整体健康、以及其它因素。因此,本发明不应当被解释为限于任何具体的剂量方案并且待施用给任何患者的精确的剂量和组合物通过主治医师考虑关于患者的所有其它因素确定。

[0172] 在某些实施方式中,本发明涉及包装的药物制剂,其包括容纳治疗有效量的本发明的制剂——单独或与第二药剂组合——的容器;和使用化合物来治疗、预防或减少患者中的疾病或紊乱的一种或多种症状的说明书。

[0173] 可以采用与常规的赋形剂混合的制剂,所述赋形剂即适合于口服、肠胃外、鼻、静脉内、皮下、肠内、或本领域已知的任何其它适合的施用模式的药学上可接受的有机或无机载体物质。药物制剂可以是无菌的并且如果需要,与助剂混合,所述助剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、影响渗透压缓冲的盐、着色剂、调味剂和/或芳香物质等等。它们也可以在需要的地方与其它活性剂例如其它镇痛剂组合。

[0174] 本发明的任何组合物的施用途包括口服、鼻、直肠、阴道内、肠胃外、含服、舌下、或局部施用。用于本发明的化合物可以被配制用于通过任何适合的途径施用,所述途径比如口服或肠胃外施用,例如,经皮、经黏膜(例如,舌下、舌、(经)含服、(经)尿道、阴道(例如,经阴道和阴道周围(perivaginally))、鼻(内)和(经)直肠)、膀胱内、肺内、十二指肠内、灌胃、鞘内、皮下、肌肉内、真皮内、动脉内、静脉内、气管内、吸入和局部施用。

[0175] 适合的组合物和剂型包括,例如,用于片剂、胶囊、囊片(caplet)、丸剂、软胶囊(gel cap)、锭剂、分散剂、悬浮剂、溶液、糖浆、颗粒剂、珠剂(bead)、经皮贴片、凝胶、粉末、

粒剂 (pellet)、乳浆剂、糖锭、乳剂、膏剂、膏药、洗液、盘剂 (disc)、栓剂、用于鼻或口服施用的液体喷雾剂、用于吸入的干粉或雾化制剂、用于膀胱内施用的组合物和制剂等等。应当理解,在本发明中将有用的制剂和组合物不限于本文中描述的具体的制剂和组合物。

[0176] 口服施用

[0177] 对于口服应用,特别适合的是片剂、糖衣片、液体、滴剂、栓剂、或胶囊、囊片和软胶囊。旨在口服使用的组合物可以根据本领域中已知的任何方法制备,并且这样的组合物可以包含选自适合于制造片剂的惰性的、无毒的药物赋形剂的一种或多种药剂。这样的赋形剂包括,例如,惰性稀释剂,比如乳糖;粒化剂和崩解剂,比如玉米淀粉;结合剂,比如淀粉;和润滑剂,比如硬脂酸镁。片剂可以不被包衣或者为了精确或者延迟释放活性成分,它们可以通过已知技术包衣。用于口服的制剂也可以呈现为其中活性成分与惰性稀释剂混合的硬的明胶胶囊。

[0178] 对于口服施用,本发明的组合物可以是通过常规手段利用药学上可接受的赋形剂制备的片剂或胶囊的形式,所述赋形剂比如结合剂(例如,聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,玉米淀粉、乳糖、微晶纤维素或磷酸钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(例如,淀粉乙醇酸钠);或湿润剂(例如,十二烷基硫酸钠)。若需要,片剂可以使用适合的方法和包衣材料被包衣,包衣材料比如,可得自 Colorcon, West Point, Pa. 的 OPADRY™ 膜包衣系统(例如,OPADRY™ OY型、OYC型、Organic Enteric OY-P型、Aqueous Enteric OY-A型、OY-PM型和OPADRY™ White, 32K18400)。用于口服施用的液体制剂可以是溶液、糖浆或悬浮液的形式。液体制剂可以通过常规手段利用药学上可接受的添加剂制备,所述添加剂比如悬浮剂(例如,山梨醇糖浆、甲基纤维素或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯树胶);非水性载体(例如,杏仁油、油脂或乙醇);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸)。

[0179] 制粒技术在药学领域中是熟知的,其用于改变活性成分的原料粉末或其它微粒材料。粉末通常与粘合剂材料混合成为较大的永久性自由流动的团块或颗粒,称为“制粒”。例如,使用溶剂的“湿”法制粒过程的特征通常在于粉末与粘合剂材料结合,并且在导致形成湿的颗粒状团块——随后溶剂必须从其蒸发——的条件下用水或有机溶剂湿润。

[0180] 熔融制粒(melt granulation)通常存在于使用在室温下为固体或半固体(即,具有相对低的软化点或熔点范围)的材料以在基本上不添加水或其它液体溶剂的情况下促进粉末状或其它材料的制粒。当被加热至熔点范围的温度时,低熔点固体液化以充当粘合剂或制粒介质。液化的固体自身扩散至与其接触的粉末状材料的表面上,并且冷却的时候,形成其中原始材料结合在一起的固体颗粒状团块。所得到的熔化颗粒然后可以提供至压片机或者被封装用于制备口服剂型。熔融颗粒通过形成固体分散体或固溶体提高了活性成分(即药物)的溶解速率和生物利用度。

[0181] 美国专利号5,169,645公开了具有提高的流动性质的直接可压缩的含蜡颗粒剂。当蜡在熔融物中与某些流动提高添加剂混合,然后冷却和制粒混合物时,获得颗粒剂。在某些实施方式中,仅蜡本身在蜡(一种或多种)和添加剂(一种或多种)的熔融物组合中熔化,并且在其它情况下蜡(一种或多种)和添加剂(一种或多种)二者均熔化。

[0182] 本发明还包括多层片剂,其包括提供延迟释放本发明的一种或多种化合物的层,和提供立即释放治疗疾病或紊乱的药物的另外的层。使用蜡/pH敏感性聚合物混合物,可以

获得其中包裹活性成分的胃不溶性组合物,以确保其延迟释放。肠胃外施用

[0183] 对于肠胃外施用,可以配制本发明的组合物用于注射或输注,例如,静脉内、肌肉内或皮下注射或输注,或者用于弹丸剂量和/或连续输注施用。可以使用在油性或水性载体——任选地包含其它配制剂(formulatory agent),比如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂——中的悬浮液、溶液或乳剂。

[0184] 另外的施用形式

[0185] 本发明的另外的剂型包括如在美国专利号6,340,475;6,488,962;6,451,808;5,972,389; 5,582,837;和5,007,790中描述的剂型。本发明的另外的剂型还包括如在美国专利申请号 20030147952;20030104062;20030104053;20030044466;20030039688;和20020051820 中描述的剂型。本发明的另外的剂型还包括如在PCT申请号WO 03/35041;WO 03/35040; WO 03/35029;WO 03/35177;WO 03/35039;WO 02/96404;WO 02/32416;WO 01/97783; WO 01/56544;WO 01/32217;WO 98/55107;WO 98/11879;WO 97/47285;WO 93/18755;和WO 90/11757中描述的剂型。

[0186] 给药

[0187] 本发明的组合物的给药取决于患者的年龄、性别和体重,患者的当前医疗状况和正在被治疗的患者的疾病或紊乱的进展。本领域技术人员能够根据这些和其它因素确定适合的剂量。

[0188] 本发明的化合物的适合的剂量可以在从大约0.001mg到大约5,000mg每天的范围,比如从大约0.1mg到大约1,000mg,例如,从大约1mg到大约500mg,比如从大约5mg到大约250mg每天。剂量可以以单次剂量或多次剂量施用,例如从1到4次或更多次每天。当使用多次剂量时,每次剂量的量可以是相同的或不同的。例如,1mg每天的剂量可以作为两个0.5mg剂量施用,剂量间的间隔为大约12小时。

[0189] 应当理解,在非限制性实例中,每天给药的化合物的量可以每天、每隔1天、每2天、每3天、每4天、或每5天施用。例如,在每隔1天施用的情况下,本发明的化合物的给药可以在周一开始,周三施用第一次随后的低剂量,周五施用第二次随后的每天低剂量,以此类推。在某些实施方式中,化合物至少每天给药一次。在又其它实施方式中,化合物至少每天给药两次。

[0190] 在其中患者的状态提高的情况下,根据医生的判断,任选地连续地给予本发明的抑制剂的施用;可选地,正在被施用的药物的剂量被临时地减少或者临时地暂停一定长度的时间(即,“药物假期”)。药物假期的长度任选地在2天到1年之间变化,包括,仅举例而言,2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。药物假期期间的剂量降低包括10%-100%,包括,仅举例而言,10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%。

[0191] 一旦患者的病情发生改善,如果必要的话,施用维持低剂量。随后,施用的剂量或频率,或二者根据病毒载量降低至保持改善的疾病水平。在某些实施方式中,针对症状和/或感染的任何复发,患者需要长期的间歇治疗。

[0192] 用于本发明的方法的化合物可以以单位剂型配制。术语“单位剂型”指的是对于正在接受治疗的患者而言适合作为单位剂量的物理离散单位,其中每个单位包含预定量的活

性材料,其被计算以任选地与适合的药物载体一起产生期望的治疗效果。单位剂型可以用于单次的日剂量或者多次的日剂量中的一个(例如,大约1到4次或更多次每天)。当使用多次日剂量时,对于每次剂量而言单位剂型可以是相同的或者不同的。

[0193] 这样的治疗方案的毒性或治疗功效任选地在细胞培养物或实验动物中确定,包括,但不限于,确定LD₅₀(50%群体致死的剂量)和ED₅₀(在治疗上对50%群体有效的剂量)。毒性作用和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,其表达为LD₅₀和ED₅₀之间的比率。从细胞培养试验和动物研究获得的数据任选地被用于配制用于人的剂量范围。这样的化合物的剂量优选地位于包含具有最低毒性的ED₅₀的循环浓度的范围内。根据所采用的剂型和利用的施用途径,剂量任选地在此范围内变化。

[0194] 仅仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到,或者能够确定本文描述的具体过程、实施方式、权利要求、和实施例的众多等价方案。这样的等价方案被视为在本发明的范围内并且由所附的权利要求书所覆盖。例如,应当理解,利用本领域认识到的替代选择且仅使用常规实验,反应条件的改变包括但不限于反应时间、反应尺寸/体积和实验试剂比如溶剂、催化剂、压力、环境条件——比如氮气气氛——和还原/氧化剂在本申请的范围内。

[0195] 应当理解,无论在本文中何处提供值和范围,被这些值和范围包含的所有的值和范围意味着包含在本发明的范围内。而且,落入这些范围内的所有值以及值的范围的上限或下限也是本申请预期的。

[0196] 下面的实施例进一步阐明了本发明的方面。但是,它们绝不是本文所陈述的本发明的教导或公开内容的限制。

[0197] 实施例

[0198] 现在,参考下面的实施例描述本发明。提供这些实施例仅出于说明的目的,并且本发明不限于这些实施例,而是包含由于本文提供的教导显而易见的所有变型。

[0199] 动物

[0200] Sprague-Dawley大鼠(300-400g)和Zucker Diabetic Fatty大鼠(250g)从Charles River实验室订货并且在使用前使其适应至少一周。如果没有另外规定,给大鼠喂食普通食物。在NAFLD逆转模型中,给大鼠喂食红花油基高脂饮食(来自脂肪的60%卡路里)(Harlan)持续指定的时间段,并且始终使大鼠自由饮水。

[0201] 为了确定ERDNP是否预防NAFLD,给大鼠喂食红花油高脂饮食持续两周,同时用ERDNP(1mg/kg)或载体每日治疗。为了诱导NASH,给大鼠喂食缺乏甲硫氨酸/胆碱的饮食(Harlan)持续八周,然后继续这种饮食同时用1mg/kg ERDNP或载体治疗它们。

[0202] 在异氟烷麻醉下进行外科手术以将聚乙烯导管(Instech Solomon)置于颈总动脉、颈静脉、和胃窦的指定的地方(分别地,PE50、PE90、和PE90管道)。使大鼠禁食6小时用于测量DAG浓度,并且禁食过夜(16小时)用于所有其它研究。对于终端研究,通过静脉内戊巴比妥使大鼠安乐死。

[0203] 对于胃内DNP输注研究,将先前喂食高脂饮食两周的大鼠置于Covance输注固定套——其附连至单轴反平衡转环支架和不锈钢单通道转环(所有都来自Instech Solomon)——以保护导管并使得动物自由进入笼。DNP(2mg/kg每天)或载体(10%二甲基亚砜/90%生理盐水载体)通过动脉管路持续输注5天。

[0204] Emerson Resources Inc.(Malvern,PA)利用缓释乙基纤维素包衣配制ERDNP。给用

于 NAFLD 逆转研究的大鼠饲喂高脂饮食 2 周, 在 2 周结束时, 用花生酱治疗它们三天以使它们适应这种食物。然后每日用与花生酱或花生酱载体混合的 ERDNP 以本文中指定的剂量治疗它们持续 5 天。每日用花生酱或花生酱载体中的 ERDNP (1mg/kg) 治疗 Zucker Diabetic Fatty 大鼠持续 14 天。每三天通过血糖仪 (Abbott) 从尾静脉测量血糖。

[0205] 如上面所描述, 给用于 NASH 逆转研究的大鼠饲喂缺乏甲硫氨酸/胆碱的饮食持续 8 周, 然后每日用 1mg/kg ERDNP 或载体治疗持续 6 周同时继续缺乏甲硫氨酸/胆碱的饮食。

[0206] 自 Jackson 订购 12 周龄的正常雄性 C57BL/6J 小鼠并且喂食普通食物。适应五天之后, 它们经历代谢笼 (CLAMS) 分析。报道的食物摄取不包括来自用于施用 ERDNP 或载体的少量花生酱 (~250mg) 的热量摄取; 然而, 花生酱的量在组之间是匹配的。

[0207] 毒性研究:

[0208] 使用 COBAS Mira Plus 测量丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶和血液尿素氮, 和通过 LC/MS/MS 测量肌酸酐。使用直肠探针 (Physitemp Instruments) 测量体温。组织学载玻片用苏木精&伊红、天狼星红 (Sirius Red) 和 TUNEL 染色法进行染色。

[0209] 基础代谢的研究:

[0210] 血浆胰岛素和胰高血糖素通过放射免疫检定法测量。血糖通过 YSI Life Sciences 2700 Select Biochemistry Analyzer 酶促地测量。十二个炎症标志物、脂联素和 FGF-21 的血浆浓度通过 ELISA (分别地, QIAGEN、Life Technologies, 和 Millipore) 分析。肝糖原通过淀粉葡萄糖苷酶消化 (Passonneau & Lauderdale, 1974, Anal. Biochem. 60:405-12) 测量。非酯化脂肪酸浓度通过酶促试剂盒 (Wako) 测量。

[0211] 为了测量用 $[3-^{13}\text{C}]$ 乳酸输注的大鼠的肝脏中总的谷氨酸富集, ~100mg 冷冻的肝脏在 400 μL 冰冷的 50% 乙腈中均化。样品在 10,000g 下离心 10min, 并分离上清液。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜储存后, 样品通过 Nanosep 100k Omega 过滤器 (Pall Life Sciences) 在 10,000g 下离心 10 min。在离子化之前, 流通物 (flow-through) 在 hypercarb 柱 (Thermo Scientific; 4.6 \times 100mm; 5 μm 颗粒尺寸) 上分离用于通过 LC/MS/MS (Applied Biosystems MDS SCIEX, 4000Q-TRAP) 的多反应监测分析。

[0212] 为了测量位置性谷氨酸和丙氨酸富集, 提取肝样品用于核磁共振 (NMR) 光谱学。~4-6g 磨碎的肝脏在 ~30mL 7% 的高氯酸中离心。根据需要, 使用 30% 氢氧化钾和 7% 高氯酸调节上清液的 pH 至 6.5-7.5, 并且提取物通过冻干脱水 2-3 天。将提取物重新悬浮在 500 μL 磷酸钾缓冲液中: 100% D_2O 中 2.4mM NaCOOH 、30mM K_2HPO_4 、10mM KH_2PO_4 、20mM DMSO (内标)。使用 AVANCE 500-MHz NMR 分光仪 (Bruker Instruments) 收集 ^{13}C NMR 谱。

[0213] 获得弛豫时间 = 1s, 虚拟扫描 = 32, 和扫描次数 = 8,192 每嵌段 \times 3 嵌段的光谱。 T_1 弛豫时间不同的校正因子由天然丰度谷氨酸和葡萄糖溶液的完全弛豫的光谱确定。根据 T_1 弛豫时间校正的 $[^{13}\text{C}]$ 谷氨酸的每个碳的峰面积通过 LC/MS/MS 的总的谷氨酸盐富集用代数方法分开。

[0214] NMR 提取物中总葡萄糖富集通过利用 100 μL 甲醇衍生 20 μL 的 NMR 提取物, 然后在 Speed-Vac 中干燥过夜来确定。然后将提取物悬浮在 75 μL 1:1 的乙酸酐:吡啶中并且在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 20min。冷却样品并用 25 μL 甲醇淬灭。每个样品的总 $m+1$ 葡萄糖富集使用先前描述的方法 (Shulman 等, 1985, J. Clin. Invest. 76:757-764) 通过气相色谱法/质谱分析法测量。发现 $m+2$ 、 $m+3$ 、 $m+4$ 、 $m+5$ 和 $m+6$ 富集是可以忽略不计的 (稳态下 <5% 的 $m+1$ 富集)。 ^{13}C NMR 谱

用于确定 [^{13}C] 葡萄糖的相对浓度。对于谷氨酸,通过质谱分析法的总葡萄糖富集用代数方法分开以测量每个葡萄糖碳的富集。

[0215] 为了测量 [$3-^{13}\text{C}$] 乳酸输注的大鼠肝脏中的位置性丙氨酸富集,如上面所描述,提取肝脏样品用于NMR,并且 [$2-^{13}\text{C}$] 和 [$3-^{13}\text{C}$] 丙氨酸的富集通过质子观察的 (proton-observed)、碳编辑的 (carbon-edited) NMR测量,如我们已经报道的 (Alves等,2011, *Hepatology* 53:1175-1181)。

[0216] 脂质测量:

[0217] 使用Wako试剂测量血浆甘油三酯。肝脏和四头肌三酰基甘油使用Bligh和Dyer的方法 (Bligh&Dyer,1959, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-7) 提取并且使用来自Diagnostic Chemicals Ltd.的试剂利用分光光度法量化。肝脏和四头肌DAG以及神经酰胺浓度通过液相色谱法/质谱分析法/质谱分析法 (LC/MS/MS) (Yu等,2002, *J. Biol. Chem.* 277:50230-6) 测量,酰基肉碱浓度也是如此 (An等,2004, *Nat. Med.* 10:268-74)。测量极低密度脂蛋白 (VLDL) 输出 (Lee等,2011, *Hepatology* 54:1650-60)。肝脏乙酰和丙二酰辅酶A浓度通过LC/MS/MS (Hosokawa等,1986, *Anal. Biochem.* 153:45-9;Roughan,1994, *Biochem. J.* 300:355-8) 测量。

[0218] 肝纤维化和细胞凋亡的标志物:

[0219] 胱天蛋白酶-3和胱天蛋白酶-9、平滑肌肌动蛋白、和炎症细胞因子在肝脏匀浆中通过 ELISA (分别地,MyBioSource、NeoBioLab、MyBioSource、和SABiosciences) 测量,并且标准化为通过Bradford试验测量的总蛋白质含量。测量肝脏羟脯氨酸含量 (Cai等,2014, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 349:94-98)。测量肝脏中的胶原蛋白mRNA,并且通过qPCR测量BAT中的UCP1mRNA (Kumashiro等,2011, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108:16381-16385)。

[0220] 葡萄糖耐量测试:

[0221] 在0时给予大鼠50%葡萄糖的腹膜内丸剂 (1mg/kg)。通过在0、5、10、20、30、45、60、和90min的时间通过静脉导管抽血获得血浆并立即离心。如本文别处所描述的,测量血糖和胰岛素浓度。

[0222] 胰岛素敏感性和肝通量的测量:

[0223] 基础和和胰岛素刺激的葡萄糖转换 (turnover) 使用 [$6,6$] $^2\text{H}_2$ 葡萄糖的稳态 (120min) 输注测量 (Erion等,2013, *Endocrinology* 154:36-44)。

[0224] 肌肉和BAT葡萄糖摄取通过将 [^{14}C] 2-脱氧葡萄糖注入静脉管路测量 (Samuel等,2007, *J. Clin. Invest.* 117:739-45)。

[0225] 肝脏中的PKC ϵ 易位和四头肌中的PKC θ 易位通过蛋白质印迹测量 (Choi等,2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104:16480-5)。

[0226] 肝脏PC通量 (V_{pc})、通过TCA循环的通量 (V_{tca}) 和对TCA循环有帮助的基质 (V_{pdh} , V_{fa}) 通过稳态 [$3-^{13}\text{C}$] 乳酸输注测量 (Perry等,2013, *Cell. Metab.* 18:740-8)。

[0227] 葡萄糖异生蛋白质浓度的测量:

[0228] 丙酮酸羧化酶、葡萄糖-6-磷酸酶、和果糖-1,6-二磷酸酶的蛋白质浓度使用来自Santa Cruz Biotechnology的抗体测量 (Kumashiro等,2013, *Diabetes* 62:2183-94)。CD69使用来自Novus Biologicals的抗体测量 (Kumashiro等,2013, *Diabetes* 62:2183-2194)。测量PKC易位 (Samuel等,2007, *J. Clin. Inv.* 117:739-745)。

[0229] DNP和ERDNP动力学研究:

[0230] 大鼠口服地消耗本文中指定的与花生酱混合的DNP或ERDNP的浓度。用于动力学研究的所有大鼠在2分钟内消耗全部花生酱和质子载体。

[0231] 在Sprague-Dawley大鼠的血浆、肝脏、肾脏、WAT、四头肌、心脏和脑中的DNP浓度通过LC/MS/MS测量(Perry等,2013,Cell.Metab.18:740-8)。在用DNP治疗之后1小时,将用DNP治疗的大鼠处死,并且在治疗后8小时,将用ERDNP治疗的那些处死,因为这些是血浆DNP研究中确定的代表峰值血浆DNP浓度的时间(图21A-21B)。方法的最低检测限被确定为0.05 μ M,因为这是已知量的DMSO与DNP的溶液的最低浓度,其通过利用在三组重复实验中每一组的误差小于20%的方法测量。

[0232] 统计分析:

[0233] 当将两组进行比较时,通过2尾未配对的学生的t试验(2-tailed unpaired Student's t-test)评估区别,或者当将三组进行比较时,利用Bonferroni的多项比较试验通过ANOVA评估区别。P值<0.05视为显著的。数据报道为平均值 \pm S.E.M。

[0234] 组织学研究:

[0235] 通过Yale Research Histology Core制备肝脏和肾脏样品并用苏木精&伊红由染色,并且如描述的(Kleiner等,2005,Hepatology 41:1313-1321)进行分析。

[0236] 肝糖原含量的测量:

[0237] 肝糖原含量通过淀粉葡萄糖苷酶消化使用先前描述的方法(Passonneau和Lauderdale, 1974,Anal.Biochem.60:405-412)评估。

[0238] 潜在的葡萄糖异生标志物的评估:

[0239] 十二个炎症标志物的血浆浓度通过ELISA(QIAGEN,Valencia,CA)测量。脂联素由Yale Diabetes Research Center Physiology Core通过ELISA测量。乳酸通过COBAS测量,并且 FGF-21通过ELISA(Millipore)测量。

[0240] 血浆和组织DNP浓度的测量:

[0241] LC/MS/MS方法建立和分析在配备有岛津超快速液相色谱(UFLC)系统的Applied Biosystems 4000 QTRAP(Foster City,CA)上进行。具有负离子检测的电喷雾离子化源显示为对DNP的定性和定量分析是最敏感的。DNP的定量分析以具有离子对(183.0/109.0)的MRM模式监测。优选的参数是:气帘气25;碰撞气9;探针温度480 $^{\circ}$ C;离子源气120;离子源气225;去簇电压(declustering potential)(DP)-45V;入口电压(entrance potential)(EP)-10V;碰撞能量(CE)-35V和碰撞池出口电压(collision cell exit potential)-12V。

[0242] 用于LC/MS/MS分析的血浆样品提取物:

[0243] 血浆样品(10-100 μ L)与包含0.01%BHT的2.0ml预冷冻的氯仿/甲醇(v/v:2/1)在5ml玻璃小瓶中混合,向其中加入250 μ l水与10nmol DNP-D₃和10nmol DNPME-D₆作为内标。在4000rpm下离心10min后,使混合物涡流10秒。小心收集底部有机层并且用稳定流的氮气干燥。将残渣在200 μ l甲醇中再造用于DNP和/或DNPME代谢物的LC/MS/MS分析。

[0244] 用于LC/MS/MS分析的不同组织样品的提取物:

[0245] 将冷冻的组织样品(\sim 100mg)称重并且悬浮在具有包含0.01%BHT的1.6ml预冷冻的氯仿/甲醇(v/v:2/1)和一个金属珠的2ml微量离心管中,然后加入10nmol DNP-d₃(Cambridge Isotopes,Andover,MA)作为内标。组织样品用Qiagen TissueLyser在30Hz下

破裂15min,然后转入5ml玻璃小瓶,接着将0.5ml氯仿和250 μ l水加入到每个样品中。在涡流10秒之后,样品在4000rpm下离心10min。收集底部有机层并用氮气的温和流干燥。残渣在200 μ l甲醇中再造用于DNP的LC/MS/MS分析。

[0246] 实施例1:DNP的制剂

[0247] 配制DNP以便于延长释放。在某些实施方式中,DNP的延长释放降低毒性和使功效最大化。在其它实施方式中,DNP制剂包括DNP挤出的或药物分层的珠,其包衣有适合于在12-24小时时期内递送1.0mg/kg的DNP的剂量尺寸的缓释包衣。

[0248] 在某些实施方式中,用于缓释包衣中的聚合物不依赖pH起作用,因为它们是可溶性和不溶性聚合物的组合,使得通过由可溶性聚合物形成的孔释放。在其它实施方式中,配制的药物在酸性的胃和/或中性的肠中被吸收。在又其它实施方式中,多微粒系统使得溶解速率较小的变化(因为片剂中包衣失效导致剂量的完全释放,而许多微粒中的一个的包衣失效将导致最低限度地改变溶解曲线)。

[0249] 在某些实施方式中,DNP珠使用挤出和滚圆制备。为了实现控释,选择两种聚合物系统用于评估:EUDRAGIT®RS/RL系统和羟丙基纤维素(HPC)/乙基纤维素(EC)系统。最初的配制工作集中于在不同的包衣水平下评估HPC/EC和EUDRAGIT®系统,并且选择 HPC/EC系统用于进一步的调研。表1阐明了用于制备ERDNP球体的原料。

[0250] 表1

[0251]	通用名称	商品名	供应商
	甘露醇	MANNITOL 100 SD	Roquette
	微晶纤维素(MCC)	MCC PH-101	FMC Biopolymer
	羟丙基甲基纤维素(HPMC)	PHARMACOAT® 606	Shin-Etsu
	乙基纤维素(EC)	ECN 10	Dow
	羟丙基纤维素(HPC)	KLUCEL® EF	Ashland
	GMS乳剂	PLASACRYL® T20	Emerson
	吐温80	---	Evonik
	滑石	---	Brenntag
	癸二酸二丁酯(DBS)	---	Vertellus
	蒸馏水	---	Emerson
	乙醇(200标准酒精度(proof))	---	Spectrum

[0252] 未包衣的2,4-DNP挤出的球体

[0253] 在某些实施方式中,基于以下三个因素选择期望的剂量重量(dosage weight):建立将可行地递送要求的剂量(1.0-1.5mg/kg)至对象的剂量重量、避免一致性问题、和避免缓释包衣问题。基于选择的剂量重量和API浓度,开发了使用常见赋形剂用于挤出的珠的制剂。设计最初的珠制剂(NK15-142、CU03-170、CU03-171)目的是递送1.5mg DNP/60mg珠;然而,这不考虑活性药物成分(API)中的22%的湿度含量,其导致实际的API浓度更接近于1.17 mg/60mg珠。与后者类似配制随后的批次,但是其被调节以递送1.0mg DNP/50mg珠(或1.17mg/58.5mg珠)。表3阐明了最初未包衣的珠制剂的组合物。

[0254] 表2

[0255]

成分	NK15-142、CU03-170、CU03-171					NK15-155				
	% w/w (湿)	g 湿/批次	% w/w (干)	g 干/批次	mg/剂量	% w/w (湿)	g 湿/批次	% w/w (干)	g 干/批次	mg/剂量
甘露醇	65.3	391.8	65.7	391.8	39.4	65.4	394.8	65.8	394.8	32.9
MCC	32.0	192.0	32.2	192.0	19.3	31.8	192.0	32.0	192.0	16.0
HPMC	0.2	1.2	0.2	1.2	12.1	0.2	1.2	0.2	1.2	0.1
2,4-DNP ¹	2.5	15.0	2.0	11.7	1.2	2.5	15.4	2.0	12.0	1.0
水	---	200.0 ²	---	---	---	---	200.0	---	---	---
总计	100.0	600.0	100.0	596.7	60.0	100.0	603.4	100.0	600.0	50.0

[0256] ¹ 2,4-DNP包含22%湿度。%w/w湿显示该批次中包含的湿API的重量百分比。干基%w/w 和mg/剂量仅考虑固体浓度,忽略API中22%湿度。

[0257] ² 水用作加工助剂并且没有出现在最终产物中。其没有表现在%w/w或最终批次重量中,并且仅被包含以显示加入用于加工的量。

[0258] 为了制备未包衣的球体,将固体成分加入到高剪切搅拌器中并混合直到视觉上均匀(300rpm的混合速度下1分钟)。加入200ml水,并混合溶液直到视觉上均匀(300rpm的混合速度下2-3分钟)。取出材料并用0.7mm模头面、9个垫片在90rpm下挤出。将挤出物分为两批,并且每一批用2mm板在980rpm下滚圆(spheronize)2分钟。然后将珠置于烘箱中并干燥直到基于初始重量最终湿度含量<7.5%。

[0259] 控释珠制剂研发

[0260] 为了实现控释(12-24hr),选择两种聚合物系统用于评估:EUDRAGIT®RS/RL系统和羟丙基纤维素(HPC)/乙基纤维素(EC)系统。

[0261] EUDRAGIT®系统通过将可渗透和不可渗透的pH独立的溶胀聚合物结合起作用,使得药物随着时间的推移扩散出去,由可渗透和不可渗透聚合物的比率与应用的聚合物的量控制。

[0262] HPC/EC系统通过将可溶性和不溶性聚合物结合以在包衣中产生孔起作用,通过所述孔药物随着时间扩散,也由聚合物的比率与应用的聚合物的量控制。用于两种包衣悬浮剂的制剂在表3中描述。

[0263] 表3

[0264]

成分	NK15-146 (Eudragit系统)				NK15-143 (HPC/EC系统)			
	% w/w	% 固体	g 固体/批次	g/批次	% w/w	% 固体	g 固体/批次	g/批次
EUDRAGIT® RS 30D	42.0	30.0	168.0	560.0	---	---	---	---
EUDRAGIT® RL 30D	10.5	30.0	42.0	140.0	---	---	---	---
ECN 10	---	---	---	---	6.92	100.0	103.8	103.8
KLUCEL® EF	---	---	---	---	0.77	100.0	11.5	11.5
PLASACRYL® T20	7.8	20.0	20.8	104.0	---	---	---	---
TEC	2.4	100.0	32.0	32.0	---	---	---	---
吐温80	0.9	33.0	4.0	12.0	---	---	---	---
滑石	---	---	---	---	1.54	100.0	23.1	23.1
DBS	---	---	---	---	0.77	100.0	11.5	11.5
去离子水	36.4	0.0	0.0	485.3	9.00	0.0	0.0	135.0
乙醇	---	---	---	---	81.00	0.0	0.0	1215.0
总计	100.0	20.0	266.8	1333.3	100.00	10.0%	100.0	1500.0

[0265] 为了利用EUDRAGIT®系统得到控释包衣,摇动并混合Plasacryl。混合的同时,

加入EUDRAGIT®、水、TEC和PS80。然后使悬浮液通过30目筛并继续混合。为了包衣如本文中别处描述所产生的DNP球体,FLM1流化床配备有底部喷雾Wurster包衣,其具有1.2mm 液体喷嘴、3mm喷气嘴、Wurster柱、400目入口筛网、conidor板、和40目过滤器。将球体装载到流化床并且使用表4中的参数包衣。珠然后在40℃的入口温度下干燥至少10min。

[0266] 表4

[0267]	参数	目标范围
	喷雾速率	15-25 g/min
	入口温度	44-47℃
	产物温度	34-37℃
[0268]	喷嘴空气	40 psi
	工艺空气	55-70 cfm

[0269] 用HPC/EC系统包衣两组珠并且在三个理论重量增加(对于NK15-144组,11.7%、13.3%、和15%,对于NK15-157组,7.5%、10%、和11.7%)下取样。每组中最终包衣的珠制剂(基于 1mg剂量和应用的最大包衣)在图5中阐明。

[0270] 表5.

[0271]	组#	NK 15-144 (15.0%重量增加)		NK 15-157 (11.7%重量增加)	
	成分	% w/w	mg/剂量	% w/w	mg/剂量
	2,4-DNP药物球体	87.0	51.3	89.5	50.0
	ECN 10	9.0	5.3	7.3	4.1
	KLUCEL® EF	1.0	0.6	0.8	0.5
	滑石	2.0	1.2	1.6	0.9
	癸二酸二丁酯	1.0	0.6	0.8	0.5
	总计	100.0	58.9	100.0	55.9

[0272] 用EUDRAGIT®系统包衣的珠展示了阻止(阻碍(clump))进入试验(run)的倾向。用 HPC/EC系统制备的延长释放珠被评估用于试验和溶解。结果在表6中描述。

[0273] 表6

[0274]	组#	%标示量
	NK15-144-01 (11.7%)	97.4
	NK15-144-12 (13.3%)	93.0
	NK15-144-23 (15.0%)	94.4
	NK15-157-01 (7.5%)	92.8
	NK15-157-12 (10.0%)	95.9
	NK15-157-23 (11.7%)	96.7

[0275] 示例性ERDNP制剂

[0276] 使用HPC/EC包衣系统开发缓释剂型(珠)。12小时的目标释放曲线通过体外溶解测试确定。代表DNP药物球体的最终制剂在表7中阐明。

[0277] 表7

[0278]	成分	% w/w	g/批次	mg/剂量
	甘露醇	65.8	394.8	32.9
	MCC	32.0	192.0	16.0
	HPMC	0.2	1.2	0.1

2,4-DNP	2.0	12.0	1.0
总计	100.0	600.0	50.0

[0279] 这些药物球体用于生成具有组合物的控释的DNP药物,如表8中所阐明的。

[0280] 表8

成分	%w/w	mg/剂量
2,4-DNP药物球体	89.5	50.0
ECN 10	7.3	4.1
KLUCEL® EF	0.8	0.5
滑石	1.6	0.9
DBS	0.8	0.5
总计	100.0	55.9

[0282] 实施例2:持续低剂量胃内DNP降低肝脏和肌肉脂质含量并提高全身胰岛素敏感性

[0283] 为了测试实现~3 μ M的持续血浆DNP浓度的持续的低剂量胃内输注DNP是否将导致脂肪肝的降低和提高全身胰岛素敏感性,用胃内DNP (2mg/kg每天) 输注大鼠持续5天。胃内DNP的这种输注速率导致血浆和肝脏中分别~3 μ M和~1 μ M的稳态血浆和组织DNP 浓度,其中骨骼肌中DNP的浓度是微不足道的(图2A)。相比之下,大鼠中DNP (5mg/kg) 的剂量导致~120 μ M的峰值血浆DNP浓度和~60 μ M的峰值DNP肝脏浓度。

[0284] 这些非常低的DNP浓度导致血浆甘油三酯的显著(>80%)降低以及肝脏和肌肉TAG和二酰基甘油(DAG)含量的>50%降低。肝脏和肌肉TAG/DAG含量的这些降低与如通过较低的空腹血糖和胰岛素浓度所指示的全身胰岛素敏感性的显著提高相关联(图1、14A-14F、14K-14L)。与全身胰岛素敏感性的这些显著提高相比,组织神经酰胺含量没有变化,并且没有与在肝酶、血液尿素氮(BUN)或肌酸酐中没有观察到变化所反映的这些长期胃内DNP 输注相关联的全身毒性(图14F-14J)。

[0285] 实施例3:ERDNP的安全性和功效

[0286] 因为这些连续的胃内DNP输注研究表明了1-3 μ M范围内的DNP的持续血浆和组织浓度逆转了NAFLD的大鼠模型中的脂肪肝和胰岛素抗性,所以进行延长释放DNP (ERDNP) 制剂的安全性和功效研究,其中给大鼠饲喂混合在少量(~1g)花生酱中的制剂。

[0287] 与DNP相比,其引起体温的剂量依赖性增加,并且在25mg/kg和大于25mg/kg的剂量下,ERDNP对体温具有微不足道的影响,在100mg/kg下仅可检测到的0.5 $^{\circ}$ C增加(图 4A-4B)。

[0288] 为了比较ERDNP和DNP在逆转饮食诱导的NAFLD中的安全性和功效,每日用变化剂量的ERDNP或DNP治疗两周高脂饲养大鼠持续5天。降低肝脏甘油三酯的ERDNP的最低有效剂量为0.5mg/kg,而降低肝脏甘油三酯的DNP的最低有效剂量为5mg/kg(图 4C-4D)。任何剂量的ERDNP没有观察到对丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、BUN或肌酸酐产生变化,而大于1mg/kg剂量的每日DNP治疗提升了AST浓度,大于2 mg/kg剂量的每日DNP治疗提升了ALT,并且DNP最高剂量提升了BUN(图15A-15H)。因此,与DNP的0.4(毒性剂量2mg/kg,治疗剂量5mg/kg)相比,对于ERDNP,毒性剂量(100mg/kg)与治疗剂量(0.5mg/kg)的比率为200,与DNP相比,ERDNP产生了毒剂量与有效剂量比率的500倍提高。

[0289] 实施例4:ERDNP和DNP的药代动力学

[0290] ERDNP相对于DNP的提高了的安全性与功效比率与ERDNP与DNP相比低得多的血浆DNP浓度有关。在用1mg/kg ERDNP(这些研究中使用的有效剂量)治疗的大鼠中血浆DNP 浓

度曲线下面积是用25mg/kg DNP (产生体温增加的最低剂量) 治疗的大鼠中血浆DNP浓度曲线下面积的20倍 (211 ± 18 对 $4,311 \pm 555$, $P=0.001$;图5A), 用DNP治疗仅1小时对用 ERDNP 治疗后8-12小时的DNP最大浓度的时间。用DNP治疗的DNP的最大血浆浓度比用ERDNP治疗的DNP的最大血浆浓度高30倍, 但是ERDNP的半衰期两倍长 (DNP的8-12 小时对ERDNP的16-24 小时)。如通过血浆浓度数据所预测的, 1天和5天的1mg/kg ERDNP 治疗后的组织DNP浓度均比用25mg/kg DNP治疗一次的大鼠中组织DNP浓度低10-20 倍 (图5B-5D)。与治疗1天或5天的大鼠相比, 用DNP (图5E) 治疗6周的大鼠中组织DNP 浓度没有区别。如通过这些数据所预测, 一定剂量的ERDNP治疗后24小时的组织DNP 浓度是检测不到的 (图5F), 与ERDNP治疗后48和72小时的DNP的组织浓度相同, 这表明了在长期ERDNP治疗下DNP不在组织中积累。

[0291] 虽然1mg/kg治疗后的峰值血浆DNP浓度在用DNP和ERDNP治疗的大鼠之间是不同的, 但是用CRNDP治疗的DNP浓度的曲线下面积是用DNP治疗的DNP浓度的曲线下面积的2倍, 这很有可能解释了在等摩尔的剂量下ERDNP提高的功效 (图4C-4D、21A-21E)。在血浆DNP浓度和体温之间观察到了强关联 (图21F)。在某些实施方式中, DNP毒性是最大血浆DNP浓度的函数。1mg/kg ERDNP治疗 (有效剂量) 之后的DNP的组织浓度比最低毒剂量的DNP (25mg/kg) 治疗之后的DNP浓度低25-100倍, 而在血浆DNP浓度已经达到稳定时期之后血浆/组织DNP的比率没有任何改变 (图21G-21I)。一定剂量的ERDNP治疗之后24小时的组织DNP浓度是检测不到的 (方法的检测下限之下, $0.05\mu\text{M}$) (图21H), 与 ERDNP治疗之后48和72小时的DNP的组织浓度一样, 这表明了在长期ERDNP治疗的情况下DNP不在组织中累积。因此, 长期DNP治疗之后的DNP浓度没有显著地不同于一次ERDNP治疗后的组织浓度, 并且在所有组织中都是 $10\mu\text{M}$ 以下 (图21J)。除了脑部之外, 组织DNP浓度与ERDNP剂量线性相关, 在脑部测量的DNP浓度在方法的检测下限处 ($0.05\mu\text{M}$) (图21K), 这意味着不存在剂量依赖性组织DNP代谢。与此一致, 1mg/kg ERDNP的长期 (5天) 剂量之后的血浆DNP浓度与第一次剂量之后的血浆DNP浓度没有不同 (图21L)。

[0292] 用1mg/kg的ERDNP治疗六周是同样地良好耐受的并且不导致行为、食物摄取、体重、体温、肝酶 (ALT/AST)、BUN或肌酸酐升高的任何改变, 并且不存在肝脏或肾脏组织学的细胞损伤或坏死的证据 (图16A-16G)。

[0293] 最后剂量之后的组织DNP浓度与1天或5天每日剂量的ERDNP之后的组织DNP浓度没有不同 (图16H)。不希望受任何理论的限制, DNP衍生物的毒性可以由DNP的最大浓度预测, 而其功效可以由血浆DNP浓度的曲线下面积预测。

[0294] 实施例5: ERDNP治疗降低高三酸甘油血症、脂肪肝和胰岛素抗性

[0295] 为了检查ERDNP是否降低组织脂质含量和提高全身胰岛素敏感性, NAFLD和胰岛素抗性的良好建立的高脂饲养大鼠模型每日用ERDNP (1mg/kg) 或载体治疗5天。尽管在研究的时候体重相同, 但是ERDNP治疗的大鼠在空腹血糖、脂肪酸和甘油三酯浓度上具有大约30-40%的降低、在脂蛋白浓度上具有30%的增加和在血浆胰岛素浓度上有50%的降低 (图6A-6D、17A-17B)。

[0296] 用ERDNP治疗的大鼠在腹膜内 (IP) 葡萄糖耐量测试期间显示了提高的葡萄糖耐量, 较低的血糖和胰岛素浓度 (图6E-6F、17G-17H)。

[0297] 为了更加完全地评估ERDNP对全身胰岛素敏感性的作用, 进行与放射性标记的葡萄糖结合的高胰岛素-正常血糖钳夹以评估肝脏和骨骼肌中的胰岛素活动 (图18A-18B)。与

通过IP葡萄糖耐量测试得到的提高的全身胰岛素敏感性一致,ERDNP治疗的大鼠需要两倍更多的葡萄糖来维持高胰岛素-正常血糖钳夹研究期间的血糖正常(图7A、18C)。ERDNP治疗的动物中胰岛素刺激的全身葡萄糖代谢的这种提高可以归因于肝脏和肌肉胰岛素敏感性二者的增加,如通过在高胰岛素-正常血糖钳夹期间ERDNP治疗的大鼠中胰岛素刺激的外周肌肉葡萄糖摄取的2.5倍增加(图7B)和肝葡萄糖生成的三倍更大的抑制(图7C-7D)所反映的。

[0298] 在肝脏和骨骼肌中二酰基甘油(DAG)诱导的nPKC激活和胰岛素抗性之间可以存在强的因果关系。一贯地,ERDNP治疗的大鼠在具有较低的三酰基甘油(TAG)和DAG含量以及分别在肝脏和骨骼肌中具有降低的蛋白激酶C(PKC) ϵ 和PKC θ 易位(图8A-8B、18D-18G)。如其较低的空腹血糖浓度所预测的,ERDNP治疗的大鼠中通过丙酮酸羧化酶的通量比对照低25%,并且PC通量的这种降低与肝乙酰辅酶A的60%降低——其是PC活性的关键变构调节因素——相关联(图8C-8D)。相比之下,与对照动物(图17C-17F)相比,在ERDNP治疗的大鼠中葡萄糖异生蛋白质表达没有区别。

[0299] 实施例6:ERDNP治疗降低肝丙酮酸羧化酶通量并增加肝线粒体脂肪氧化的速率

[0300] ERDNP对肝线粒体TCA(V_{TCA})通量、 V_{PDH} 通量、 V_{fa} 通量和 V_{PC} 通量的速率的作用使用新型组合的NMR-LC/MS/MS方法(Perry等,2013,Cell.Metab.18:740-8)评估。与其降低的肝脏脂质含量一致,在一天的治疗之后,ERDNP治疗的大鼠中的肝脏TCA循环通量增加了60%。而且, V_{TCA} 通量的这种增加完全是由于肝脂肪氧化的速率的65-70%的增加(图8E)。相比之下,相对于肾脏、脑、心脏、或骨骼肌,脂肪氧化不存在区别,这表明ERDNP的解偶联作用限于肝脏(图17I)。

[0301] 在一方面,较低的骨骼肌TAG含量可以至少部分由于降低的肝的极低密度脂蛋白(VLDL)输出——其由于增加的肝脂肪酸氧化。肝脏VLDL输出在ERDNP治疗的动物中降低80%(图8F)。

[0302] 相比之下,没有观察到肝脏或四头肌酰基肉碱和神经酰胺、肝糖原含量、十二个炎症标志物、脂联素或FGF-21的血浆浓度的区别,由此由ERDNP诱导的肝脏和肌肉胰岛素应答的提高解离这些代谢物和脂肪细胞因子(图18H-18S)。此外,棕色脂肪组织质量、胰岛素刺激的葡萄糖摄取、或解偶联蛋白-1(UCP1)mRNA表达中不存在区别(图18X-18Z)。

[0303] 为了检查利用ERDNP解偶联是否降低组织脂质含量和提高胰岛素敏感性,每日用ERDNP(1mg/kg)或载体治疗NAFLD和胰岛素抗性的良好建立的高脂饲养大鼠模型持续5天。尽管在研究的时候体重和白色脂肪组织含量相同,但是ERDNP治疗的大鼠比其载体治疗的对照组(counterpart)是显著地更加胰岛素敏感的,显示空腹血糖、脂肪酸和甘油三酯浓度的30-40%的降低,高密度脂蛋白浓度的30%的增加和血浆胰岛素浓度的50%的降低,而在肝葡萄糖异生蛋白表达上没有任何区别(图6A、6C、6G、17A、17C-17F、17J-17K)。

[0304] 实施例7:ERDNP提高全身胰岛素抗性

[0305] 贯穿腹膜内(IP)葡萄糖耐量测试,用ERDNP治疗的大鼠表现了提高的葡萄糖耐量,降低的血糖和胰岛素浓度(图6E-6F、17I-17J)。为了更加完全地评估ERDNP对全身胰岛素敏感性的作用,进行与放射性标记的葡萄糖结合的高胰岛素-正常血糖钳夹以评估肝脏和骨骼肌中的胰岛素活动(图18A-18B)。与提高的全身胰岛素敏感性一致,ERDNP治疗的大鼠需要两倍更多的葡萄糖来维持高胰岛素-正常血糖钳夹研究期间的血糖正常(图7A、18C)。不

希望受任何理论的限制, ERDNP治疗的动物中胰岛素刺激的全身葡萄糖代谢的提高可以归因于肝脏和肌肉胰岛素敏感性二者的增加, 如通过在高胰岛素-正常血糖钳夹期间(图 7C、18T) ERDNP治疗的大鼠中胰岛素刺激的外周肌肉葡萄糖摄取的2.5倍增加和肝葡萄糖生成的三倍更大的抑制所反映的。在肝脏和骨骼肌中异常的二酰基甘油(DAG)累积和胰岛素抗性之间存在强的因果关系。ERDNP治疗的大鼠具有较低的三酰基甘油(TAG)和DAG含量以及分别在肝脏和骨骼肌中具有降低的蛋白激酶C ϵ (PKC ϵ)和PKC θ 易位(图8A-8B、18D-18F、18U-18V)。骨骼肌甘油三酯的降低与40%更低血浆甘油三酯浓度和肝脏极低密度脂蛋白(VLDL)输出的80%的降低相关联(图6B、8F), 这解释了作为肝特异性解偶联的结果的降低的肌肉脂质含量。

[0306] 本文呈现的数据表明大鼠中不存在体温过高, 并且与利用在饮用水中高得多的剂量的 DNP ($\sim 89\text{mg}/[\text{kg}\cdot\text{天}]$) 治疗的小鼠中降低的UCP1 mRNA表达形成对比, 这强调了本发明的制剂的安全性。ERDNP在预防NAFLD的发展中类似地有效: 饲喂高脂饮食持续2周并且同时饲喂ERDNP的大鼠具有较低的空腹血糖、NEFA和胰岛素浓度, 其与肝脏、血浆和骨骼肌中甘油三酯浓度的50-90%降低相关联(图22A-22F)。为了更决定性地检查ERDNP治疗对全身能量代谢的作用, 综合实验室动物监测系统(Comprehensive Lab Animal Monitoring System)(CLAMS)代谢笼研究在饲喂ERDNP或载体的小鼠中进行, 并且在任何检测到的参数中没有观察到区别(图23A-23H)。这些数据再次表明了局限于肝脏的非常低水平的解偶联——其不能利用相对不灵敏的CLAMS研究测量——足以降低肝脏脂肪含量并提高全身胰岛素抗性, 而不影响食物摄取、行为或全身能量消耗。

[0307] 实施例8: ERDNP治疗逆转Zucker Diabetic Fatty大鼠中的糖尿病

[0308] 由于ERDNP治疗安全地逆转了高脂饲养大鼠中的NAFLD、高三酸甘油血症以及肝和外周胰岛素抗性。在某些实施方式中, ERDNP可以逆转良好建立的T2D的肥胖大鼠模型——Zucker Diabetic Fatty (ZDF) 大鼠(摄食过度的缺乏瘦蛋白的肥胖大鼠模型)——中的高血糖症、高三酸甘油血症和脂肪肝(hepatic steatosis)。

[0309] 为此, 每日用ERDNP ($1\text{mg}/\text{kg}$) 治疗高脂饲养ZDF大鼠持续14天。ERDNP治疗与血糖浓度的进行性降低和治疗2周后空腹血糖浓度的 $400\text{mg}/\text{dL}$ 降低以及空腹血浆胰岛素浓度的80%降低相关联, 尽管治疗前后体重相同(图9A-9B、19A)。与提高的胰岛素敏感性一致, ZDF大鼠在14天的ERDNP治疗之后也具有较低的空腹血浆甘油三酯浓度(图 8C-8D)。ERDNP治疗的大鼠也显示了肝乙酰辅酶A含量的60%的降低, 其是患糖尿病动物中葡萄糖异生和血糖过多的关键调节因素(图19L)。

[0310] ERDNP治疗的大鼠在腹膜内葡萄糖耐量测试期间显示了提高的葡萄糖耐量, 在GTT期间的每个时间点处血糖和胰岛素浓度降低50-80%, 和ERDNP治疗的组中总葡萄糖和胰岛素曲线下面积降低60-70%(图9E-9F、19B-19C)。胰岛素敏感性和葡萄糖耐量的这些提高与肝脏TAG浓度的65%降低和四头肌TAG浓度的55%降低相关联(图19D-19E)。利用两周治疗没有检测到肾毒性, 如血浆BUN没有改变和肌酐浓度的适度降低所反映的(图 19F-19I)。相比之下, 肝酶(AST, ALT)和肝TAG含量在治疗之前在ZDF大鼠中增加, 这反映了脂肪肝与这些缺乏控制的患糖尿病动物中的肝炎症相关联; ERDNP治疗将这些参数正常化, 这反映了用ERDNP治疗的NASH和T2D的该大鼠模型中脂肪肝和肝炎症的逆转(图19F-19I)。组织学分析确定了该缺乏控制的患糖尿病模型中利用ERDNP治疗的 NAFLD的解决(图9I), 这强调了

ERDNP是NAFLD相关的肝疾病的治疗剂的可能性。

[0311] 实施例9:ERDNP治疗NAFLD诱导的NASH

[0312] 为了调研ERDNP改善或治疗NAFLD诱导的NASH的可能性,给大鼠喂食缺乏甲硫氨酸/胆碱的饮食(MCD)持续8周以诱导NASH。6周的ERDNP治疗降低了肝脏甘油三酯浓度90%并使血浆转氨酶浓度正常化(图20A-20C)。与由转氨酶浓度的正常化所指示的肝炎症的降低一致,在相对于对照大鼠的ERDNP治疗的大鼠中,ERDNP治疗的大鼠显示了肝脏中五种炎症细胞因子的较低浓度和降低的肝脏CD69蛋白——活化的T细胞的标志物(图20D、24A-24B)。组织学分析确定了ERDNP治疗的大鼠肝脏中NAFLD和肝纤维化的解决,其中肝纤维化评分(score)降低90%,以及伴随的胶原蛋白mRNA、平滑肌肌动蛋白、和羟脯氨酸浓度的降低(图20F-20I)。用ERDNP治疗的大鼠也展现了细胞凋亡的降低,以及较低的胱天蛋白酶-3和胱天蛋白酶-9蛋白表达,但是没有检测到TUNEL染色的区别(图20J-20K、24C)。患有肝硬化的患者展现了降低的餐后肝糖原合成,并且因此在MCD饲养大鼠肝脏中测量肝糖原含量。在ERDNP治疗的大鼠中观察到肝糖原合成的80%增加,其与这些动物中空腹低血糖症的逆转相关联(图24D-24E)。ERDNP提高肝脏合成功能,如血浆白蛋白浓度的20%增加所指示的(图20L)。这些数据表明了NASH模型中,除了肝纤维化的逆转,肝脏蛋白质和碳水化合物合成功能的提高,并且强调了ERDNP作为NAFLD相关的NASH的治疗剂以预防肝硬化和潜在地肝细胞癌的功效。

[0313] 本文中引用的每一个和每个专利、专利申请和出版物的公开内容在此通过引用以其全部并入本文。虽然本发明已经参照具体实施方式进行了公开,但是显而易见的是本发明的其它实施方式和变化可以由本领域其它技术人员设计而不背离本发明的真实精神和范围。所附权利要求书意欲解释为包含所有这样的实施方式和等价变型。

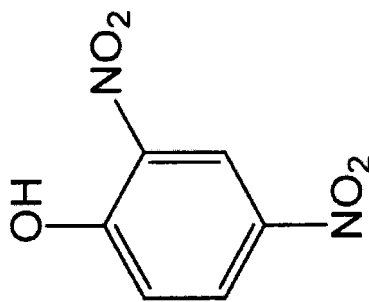


图1

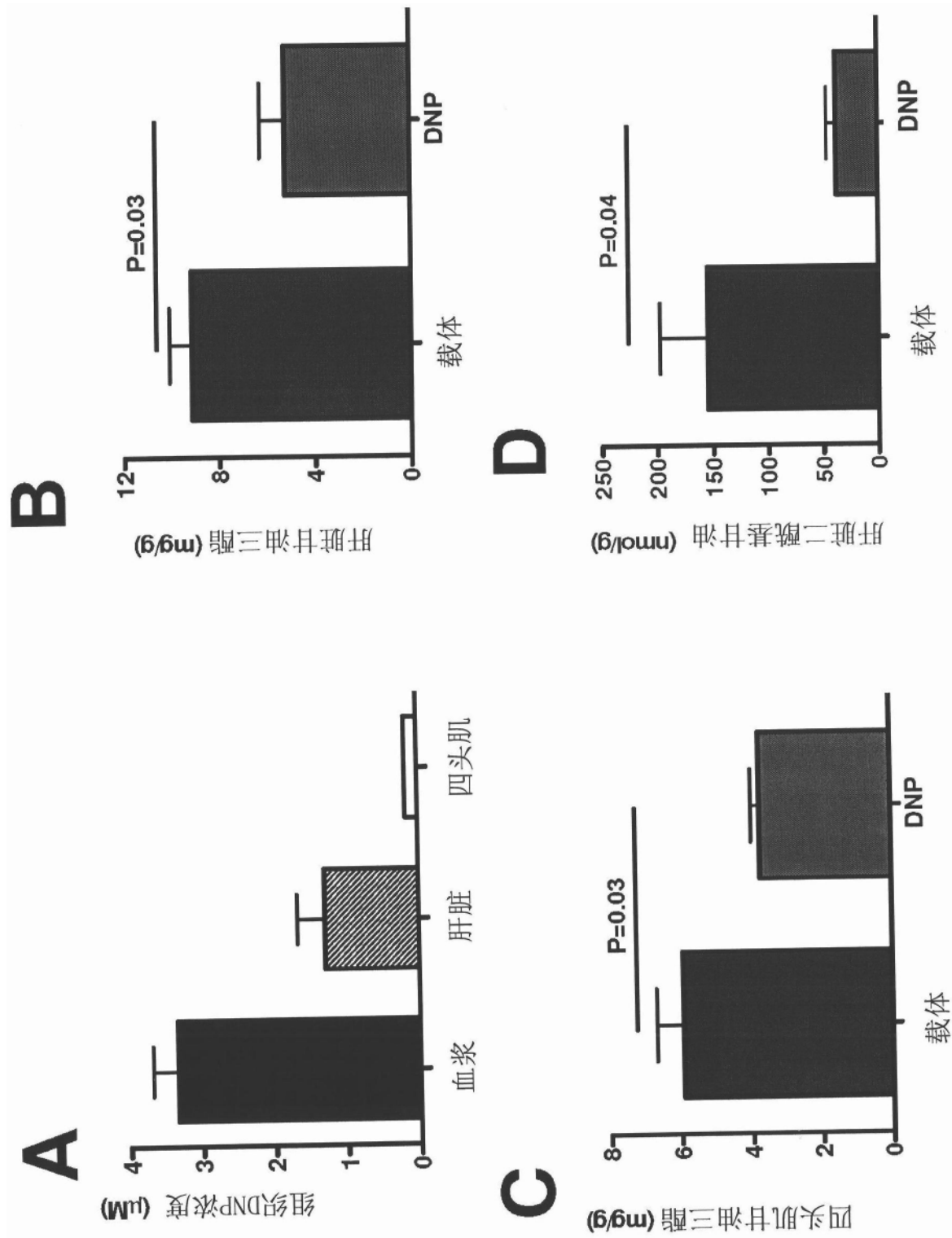


图2A-2D

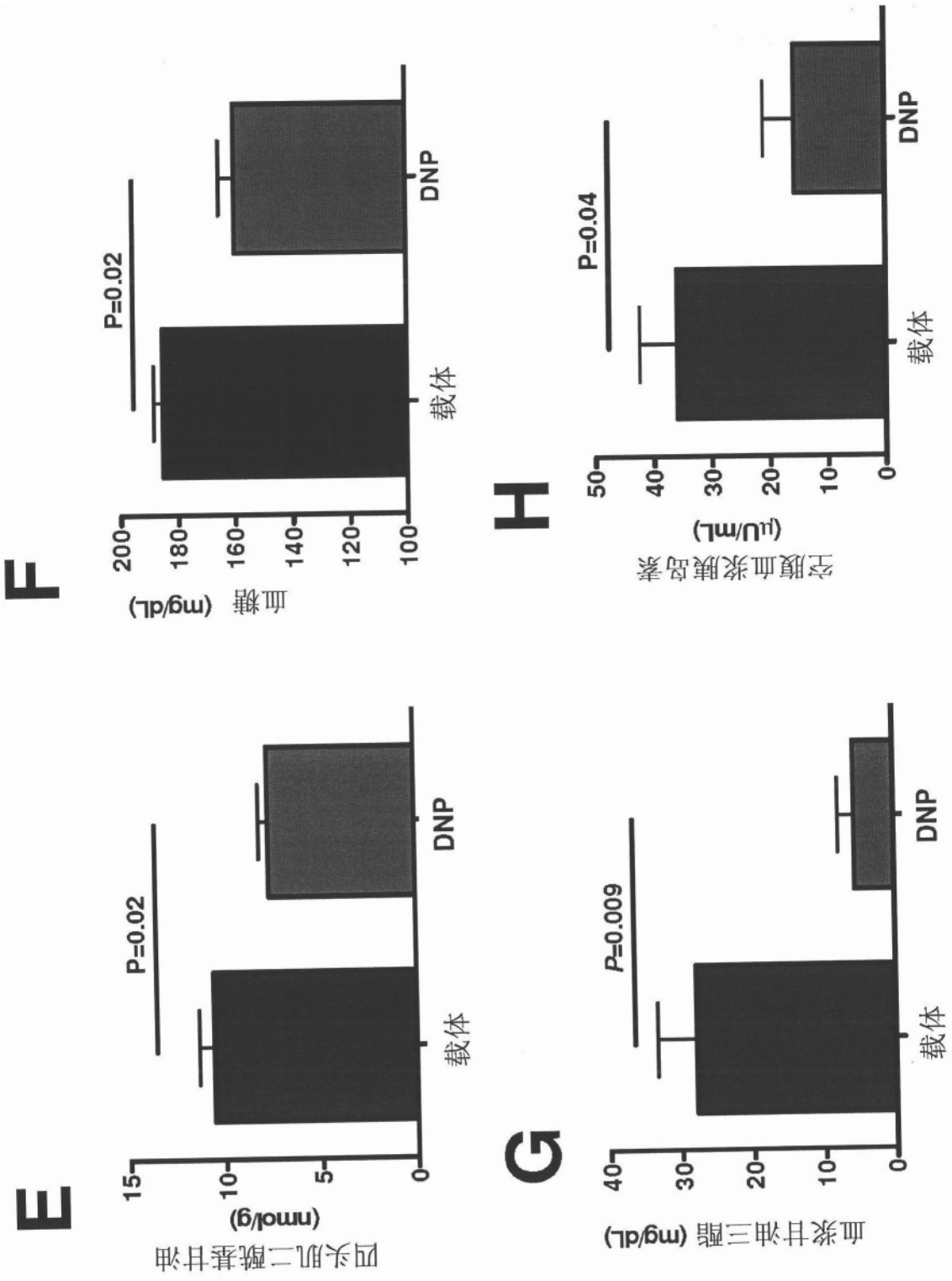


图2E-2H

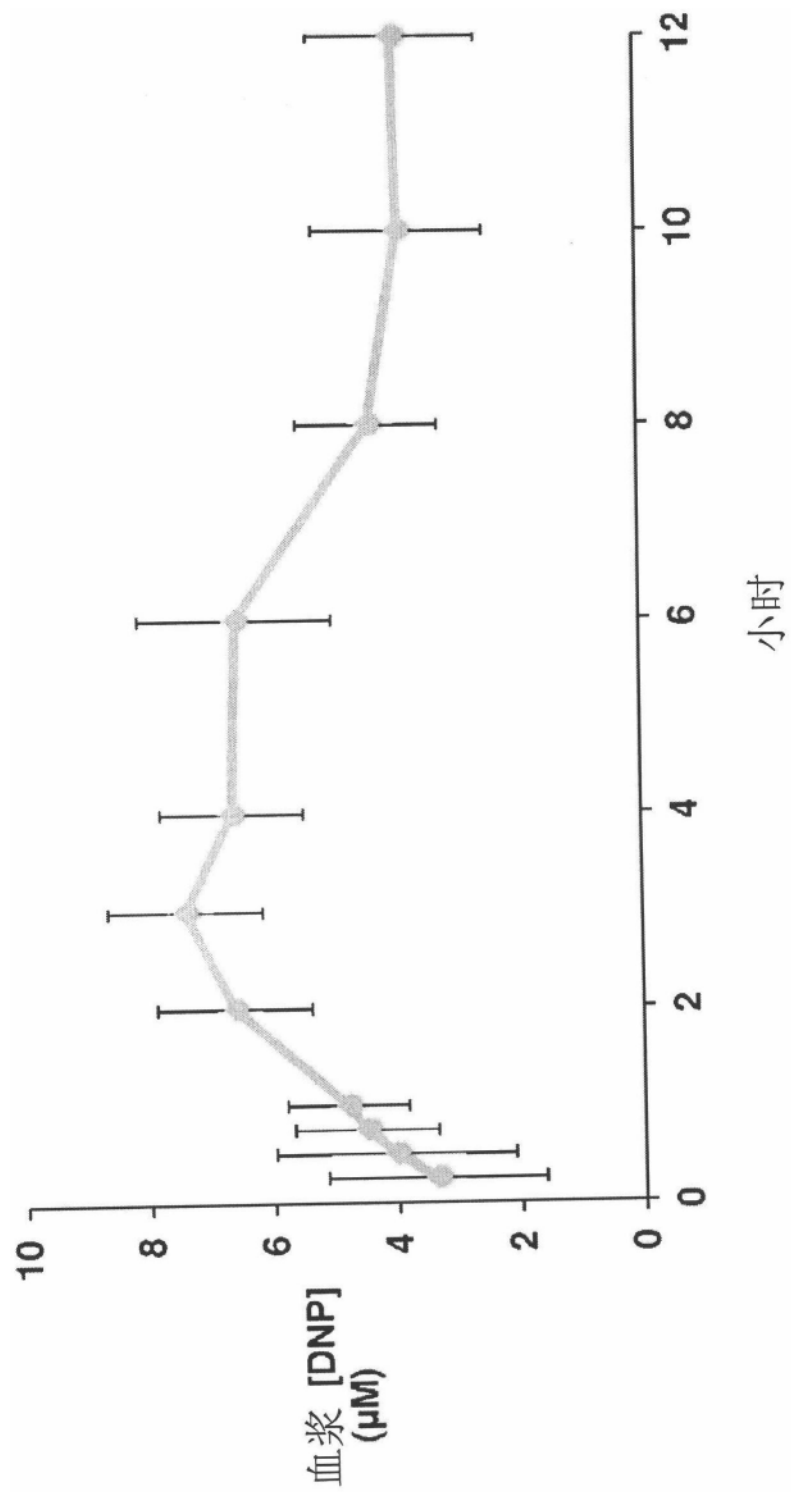


图3

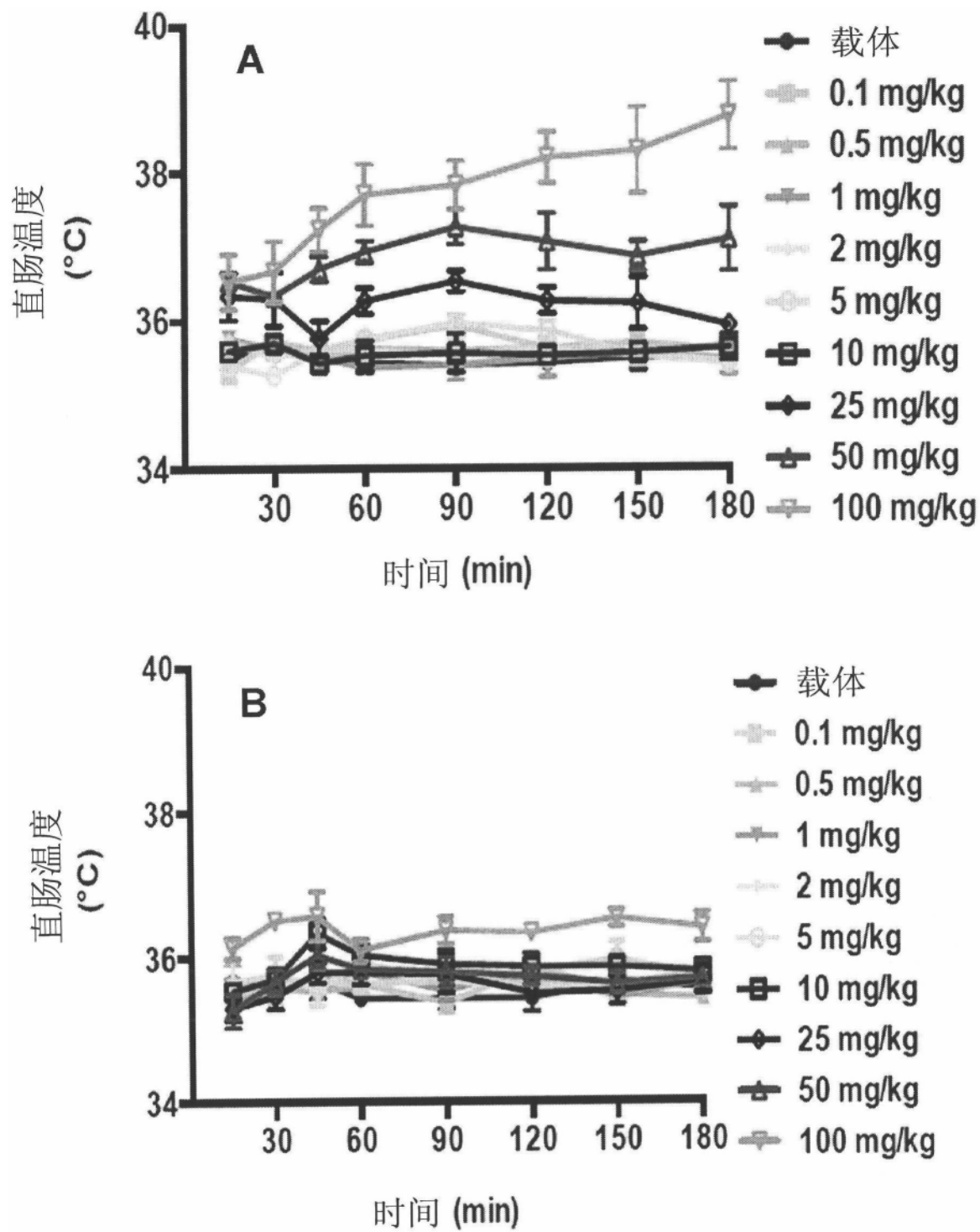


图4A-4B

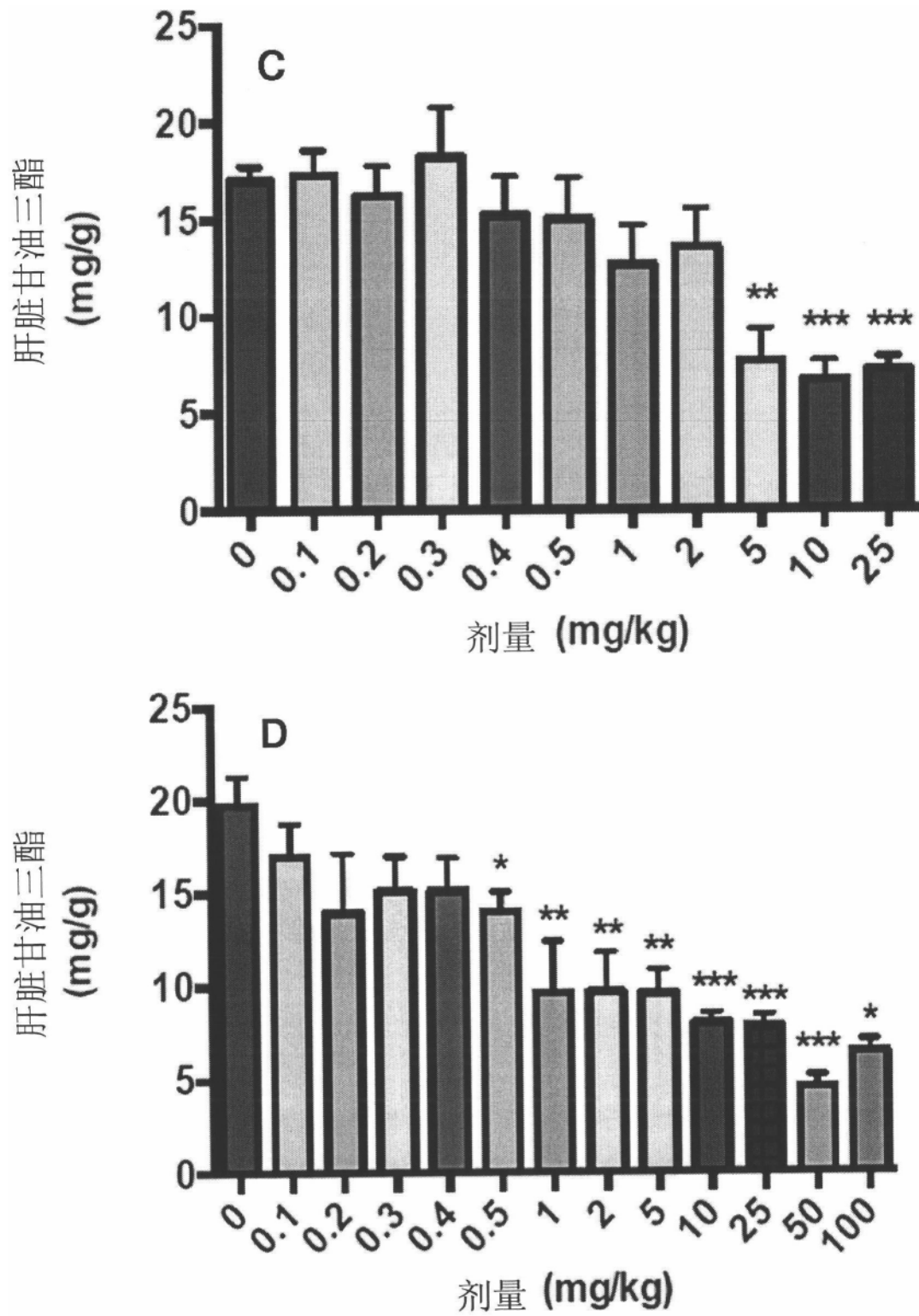


图4C-4D

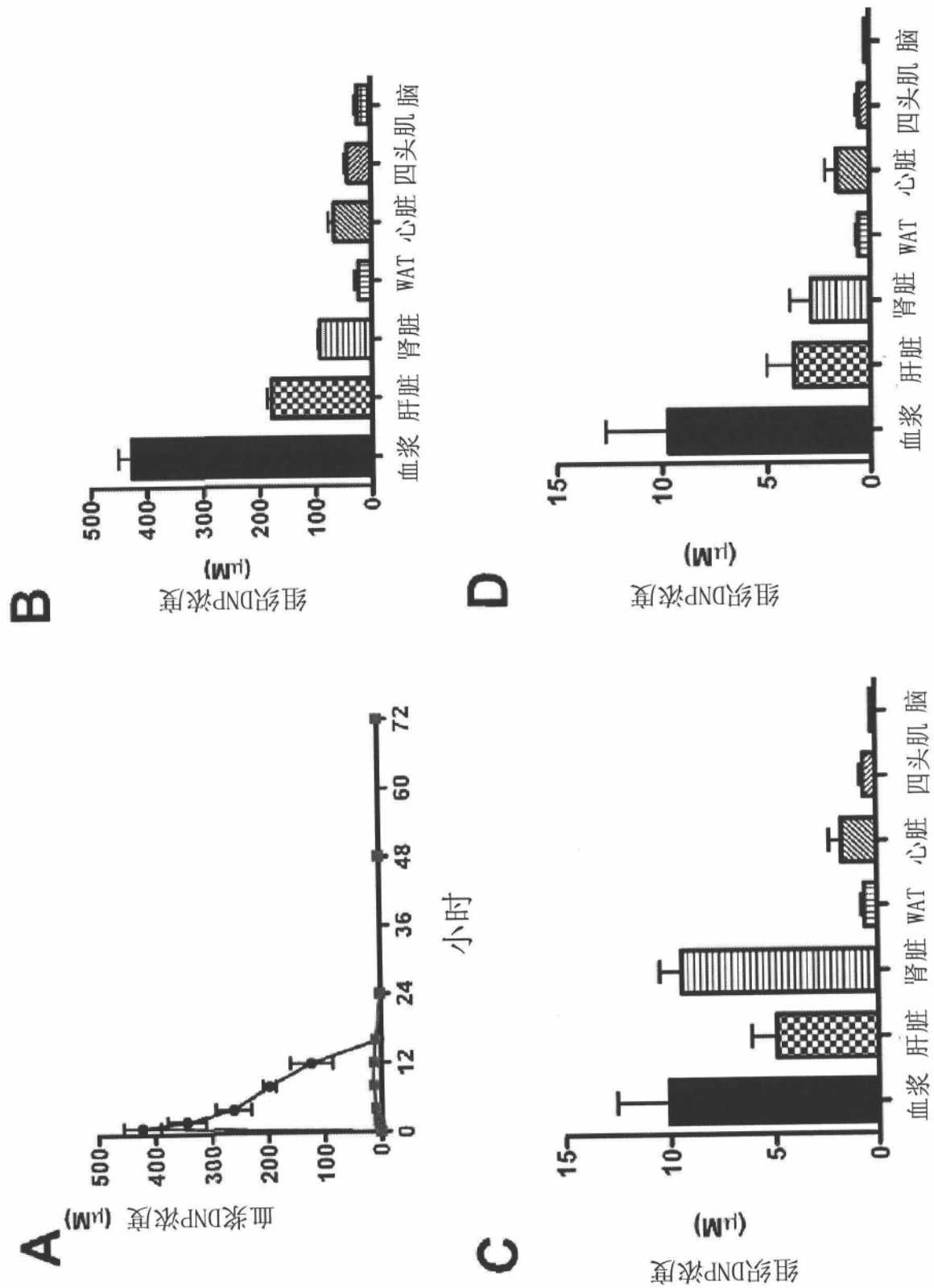


图5A-5D

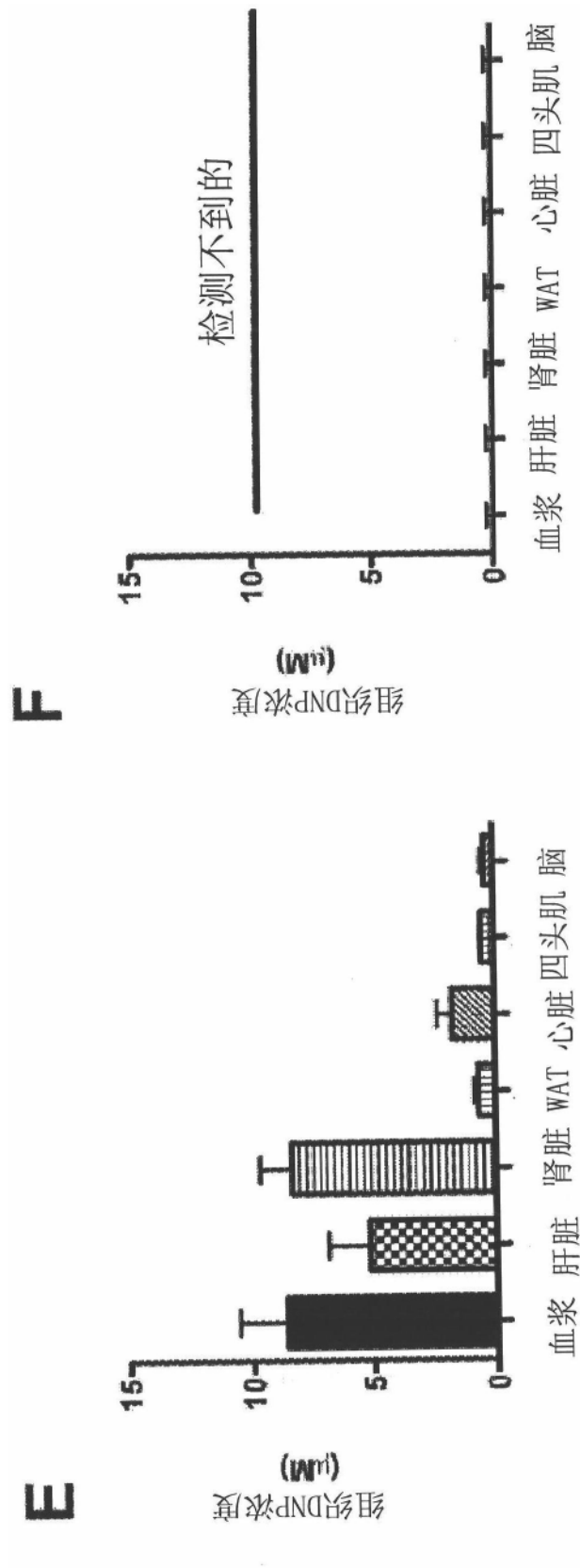


图5E-5F

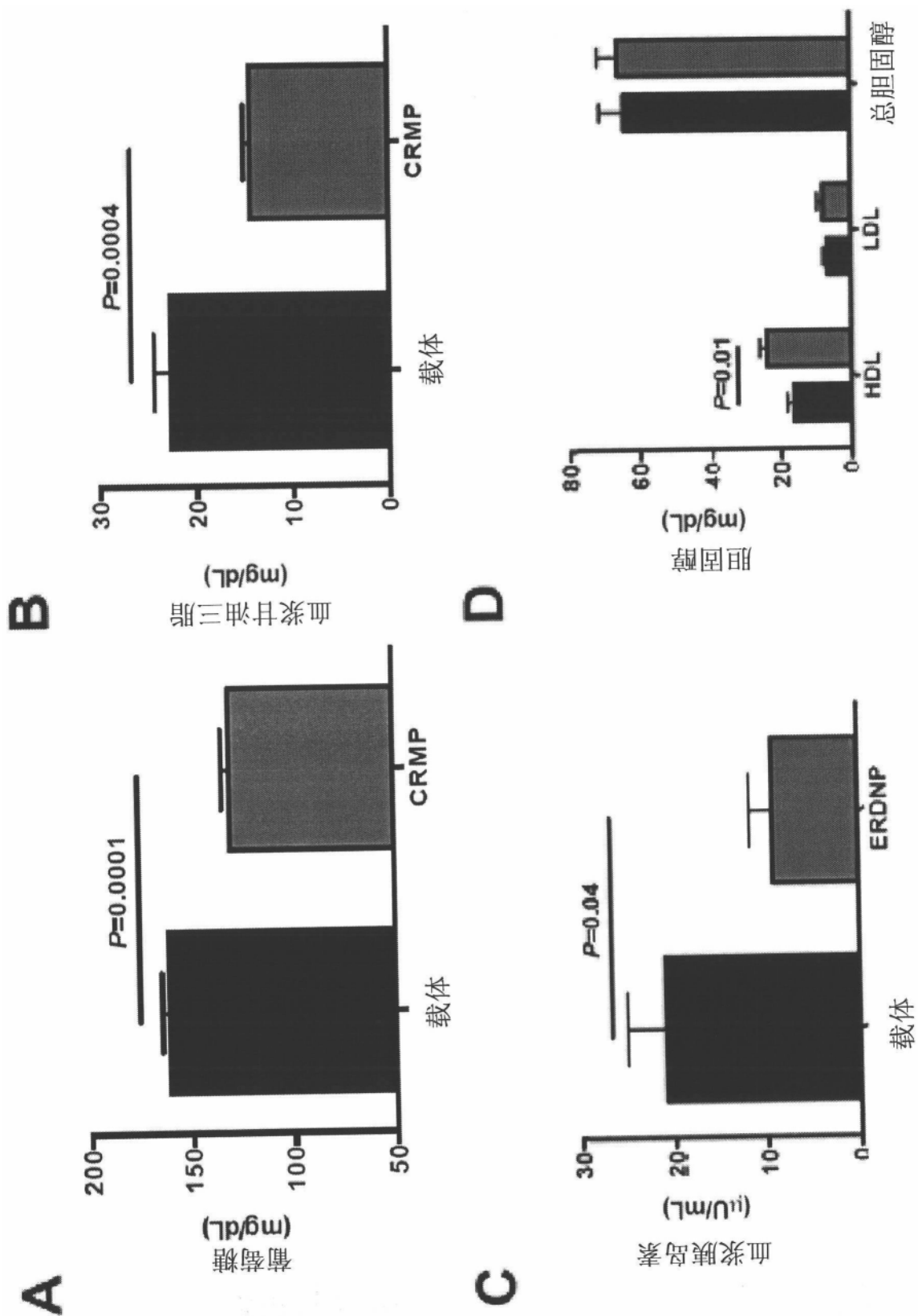
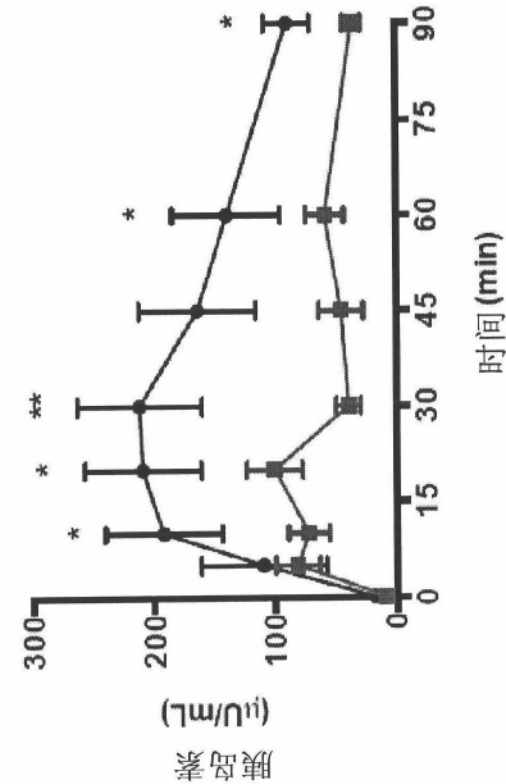
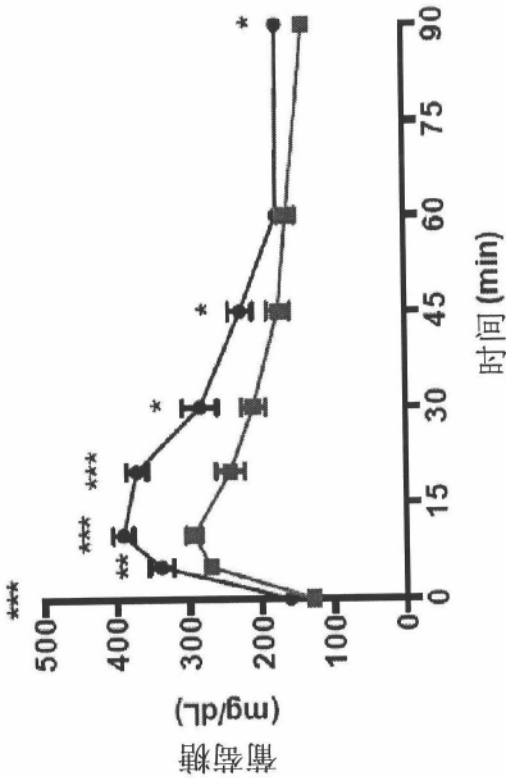


图6A-6D

F



E



G

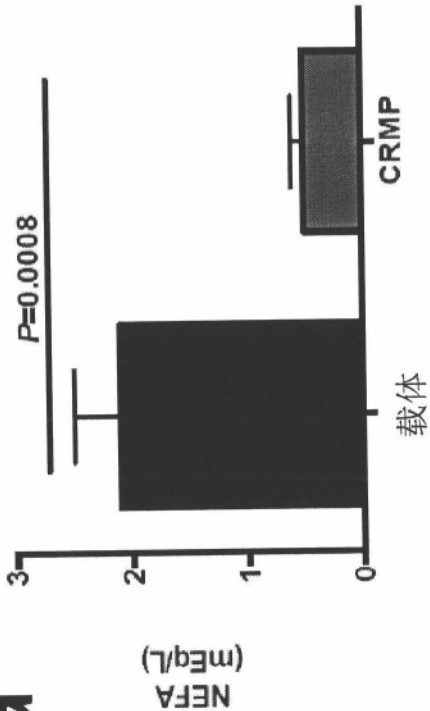


图6E-6G

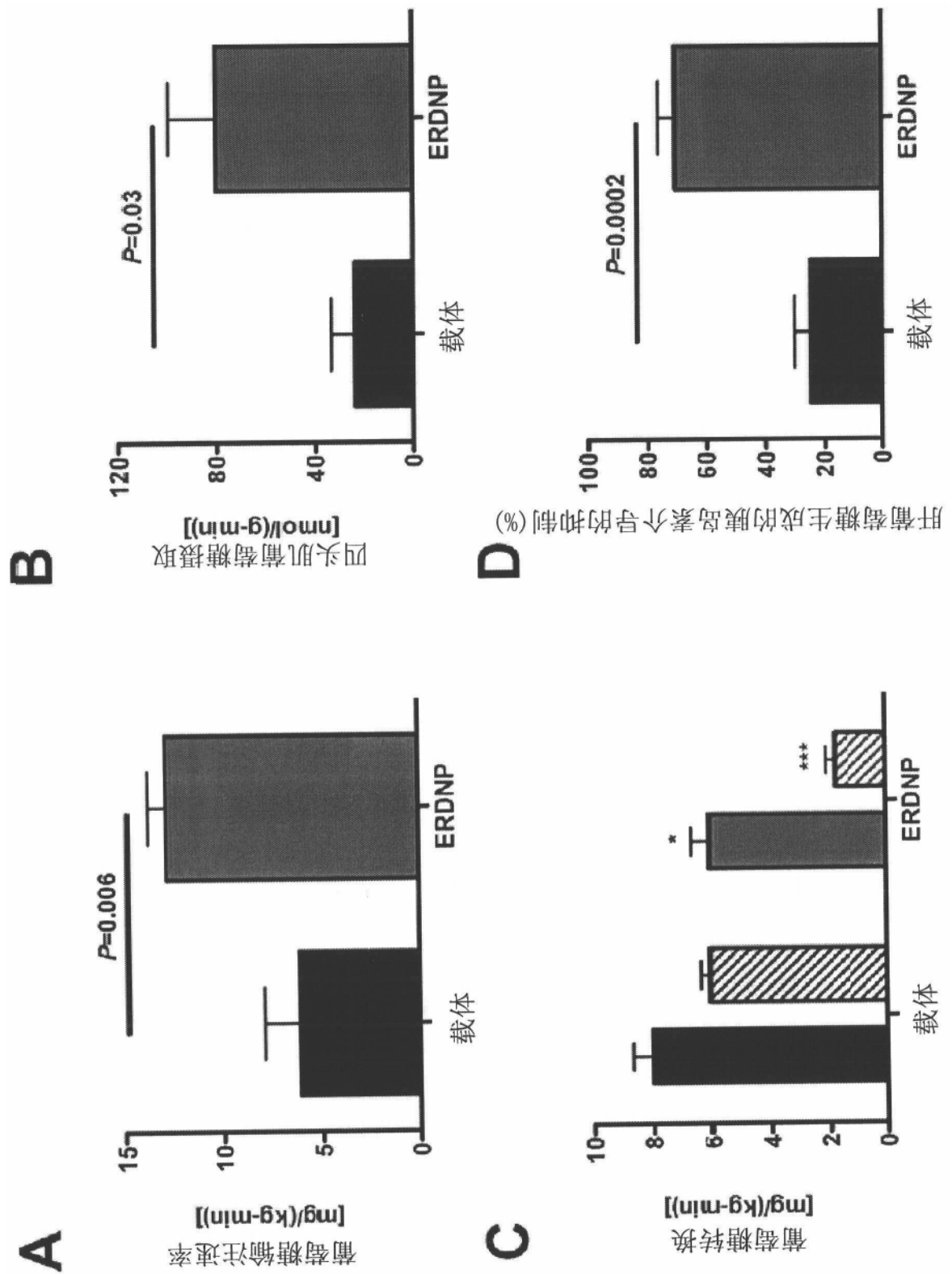


图7A-7D

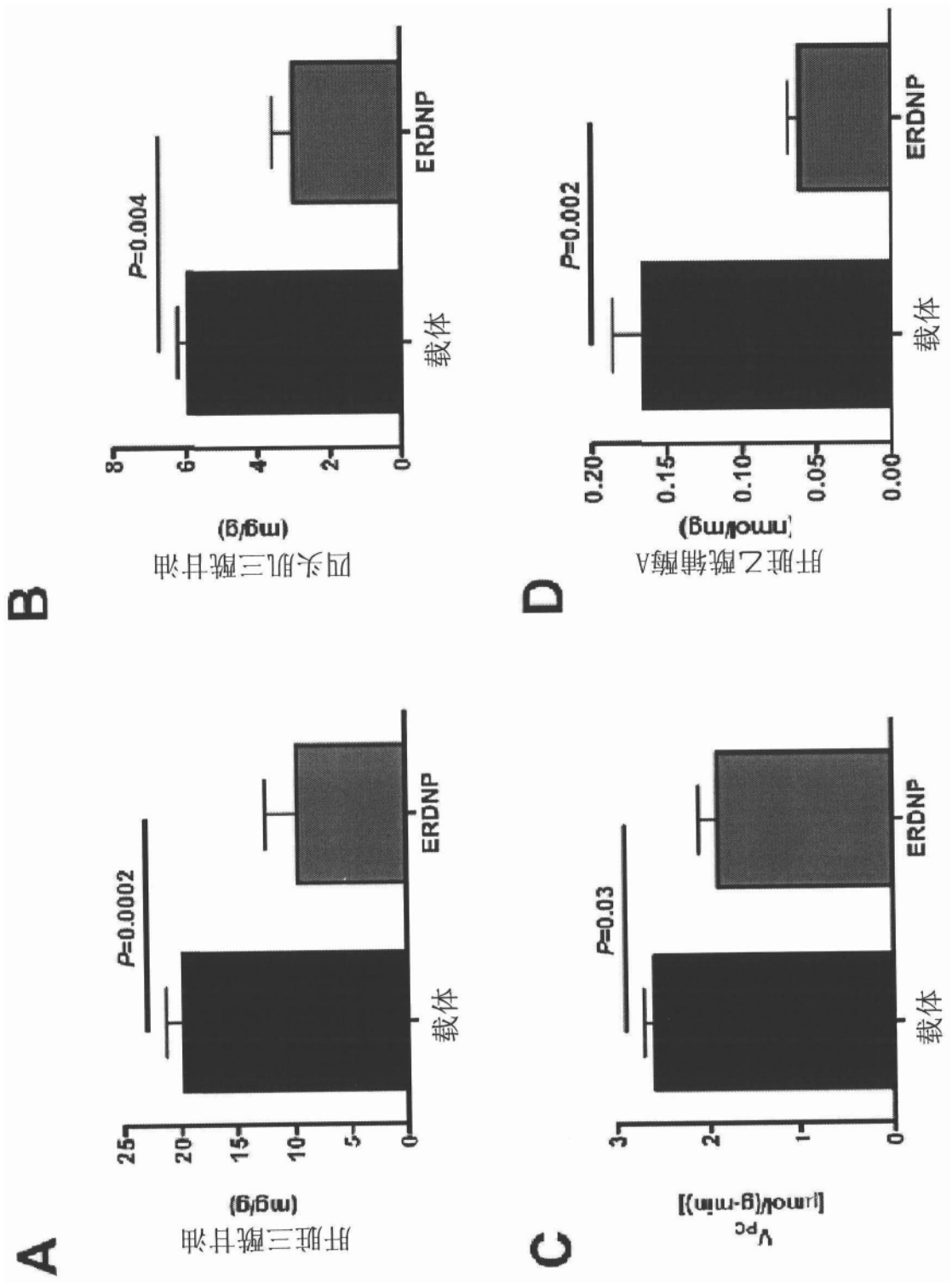


图8A-8D

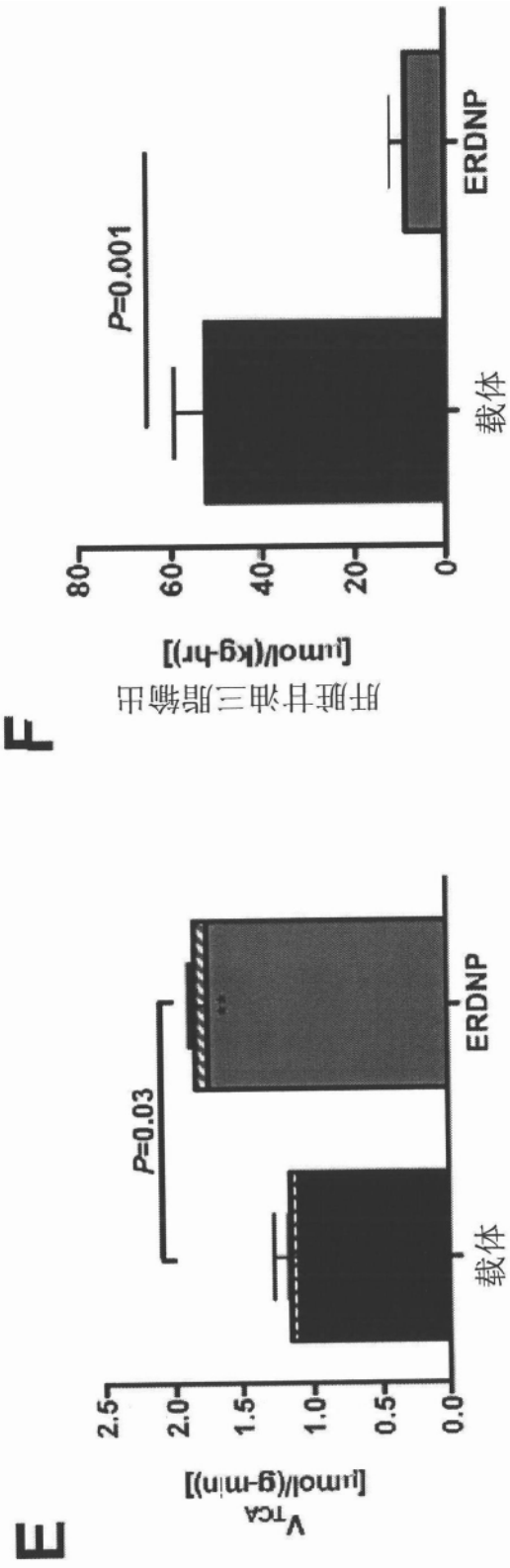


图8E-8F

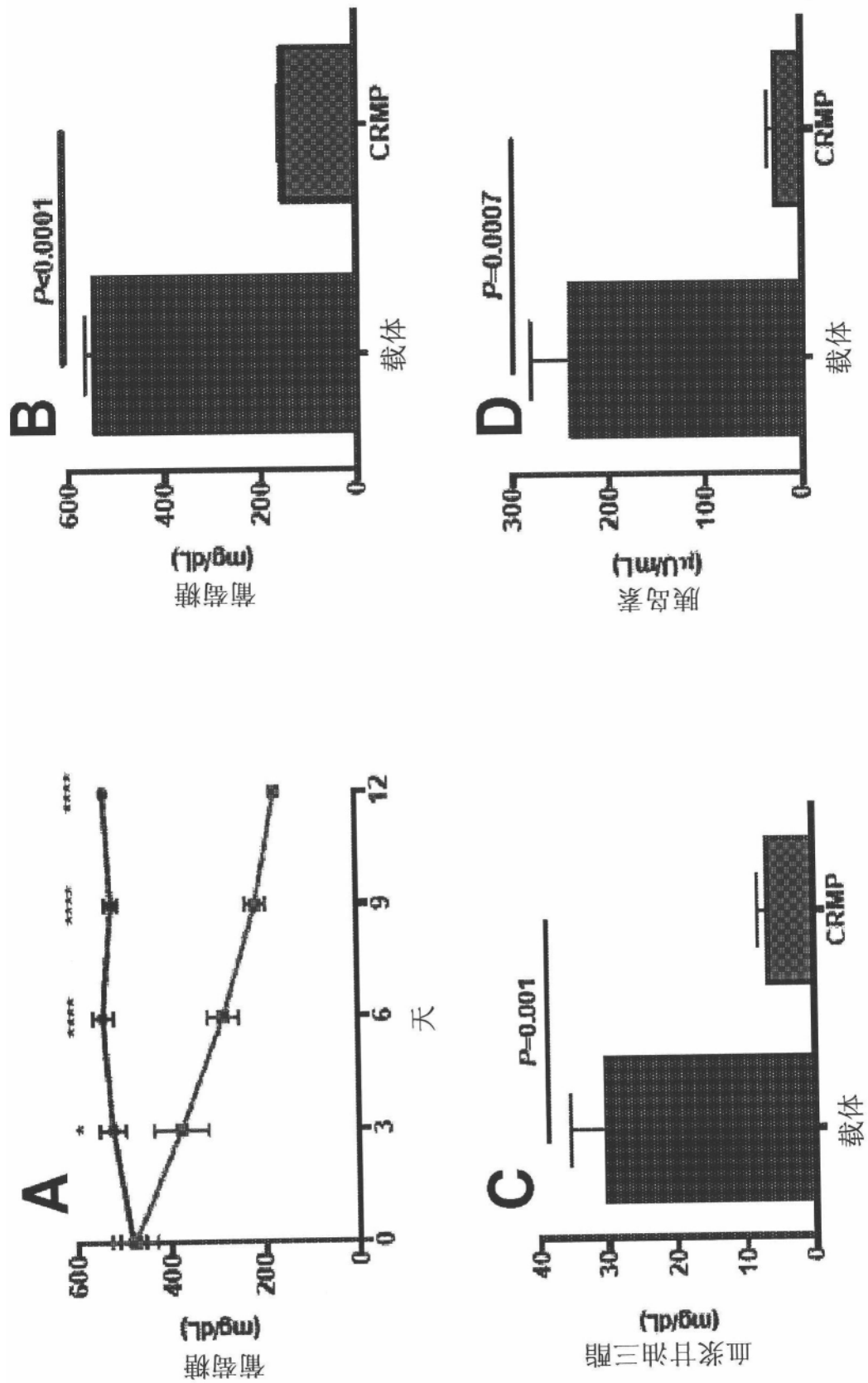


图9A-9D

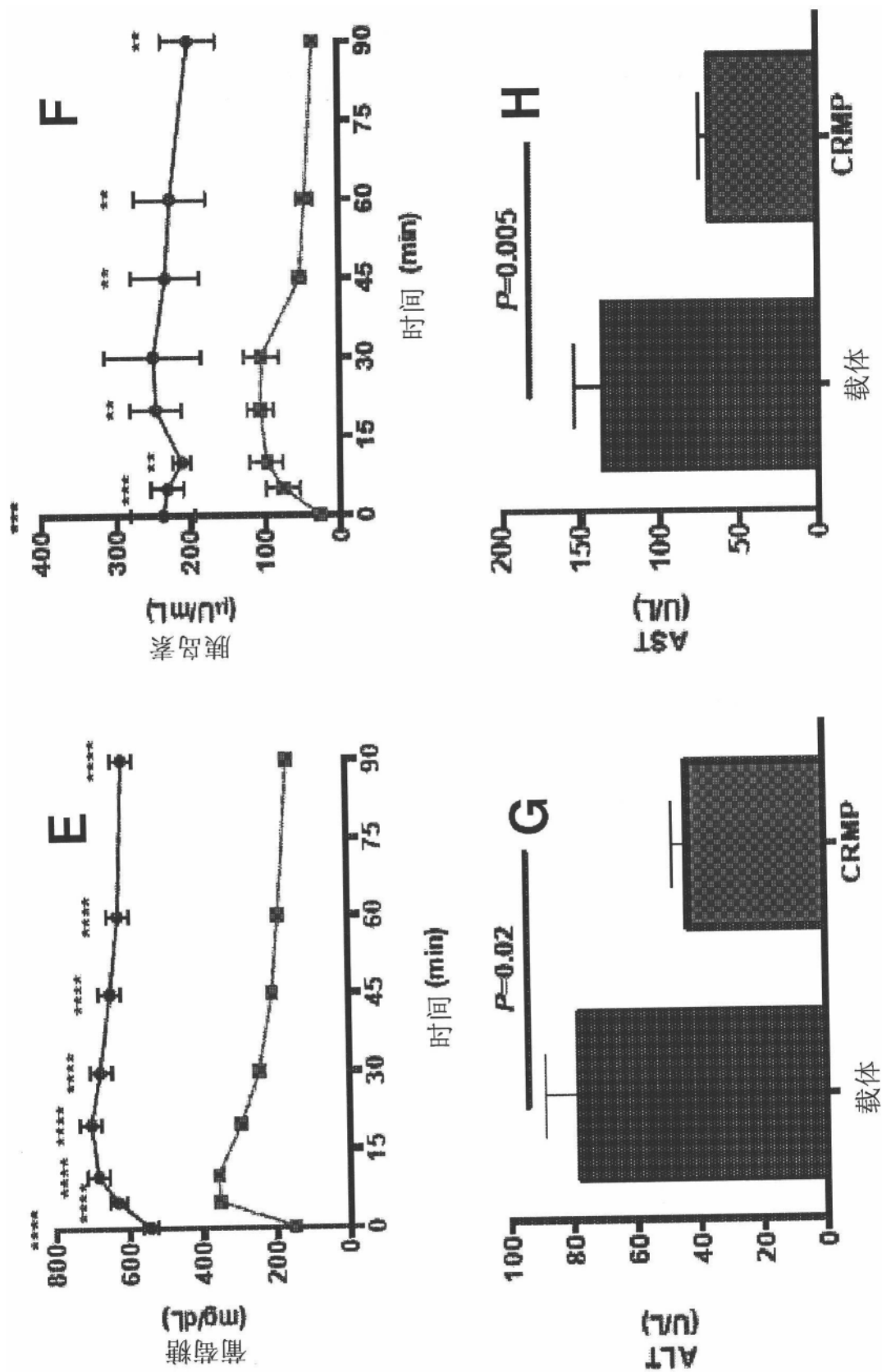


图9E-9H

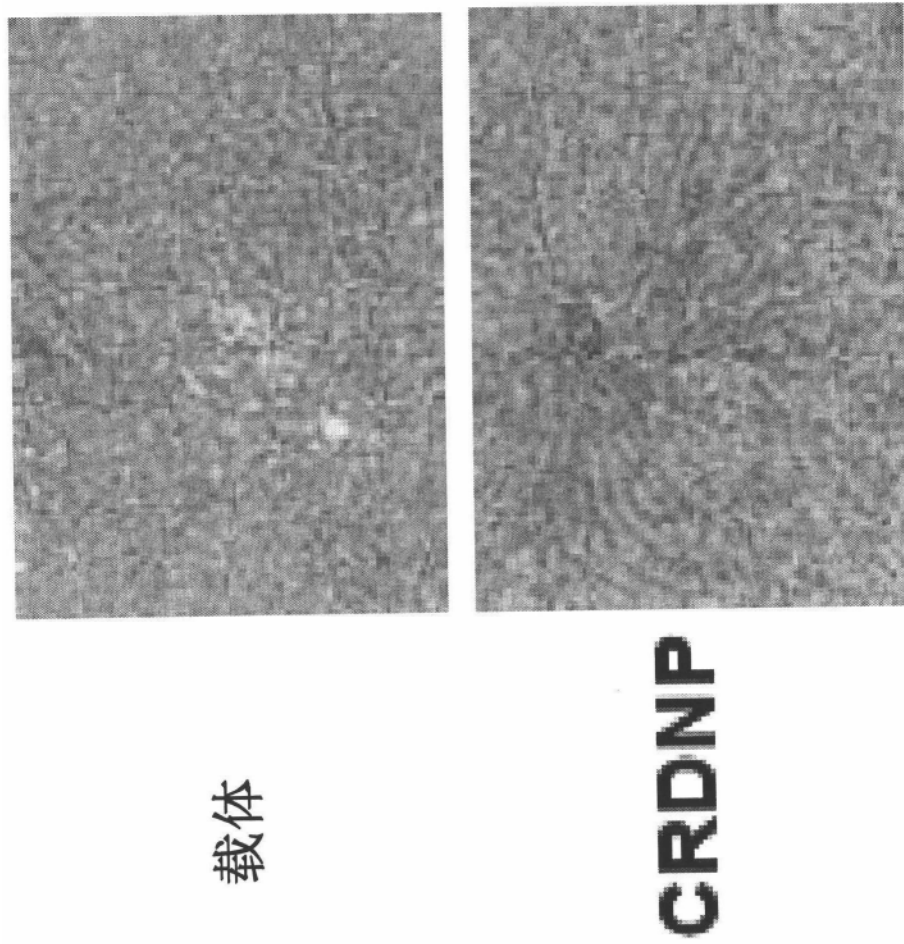


图9I

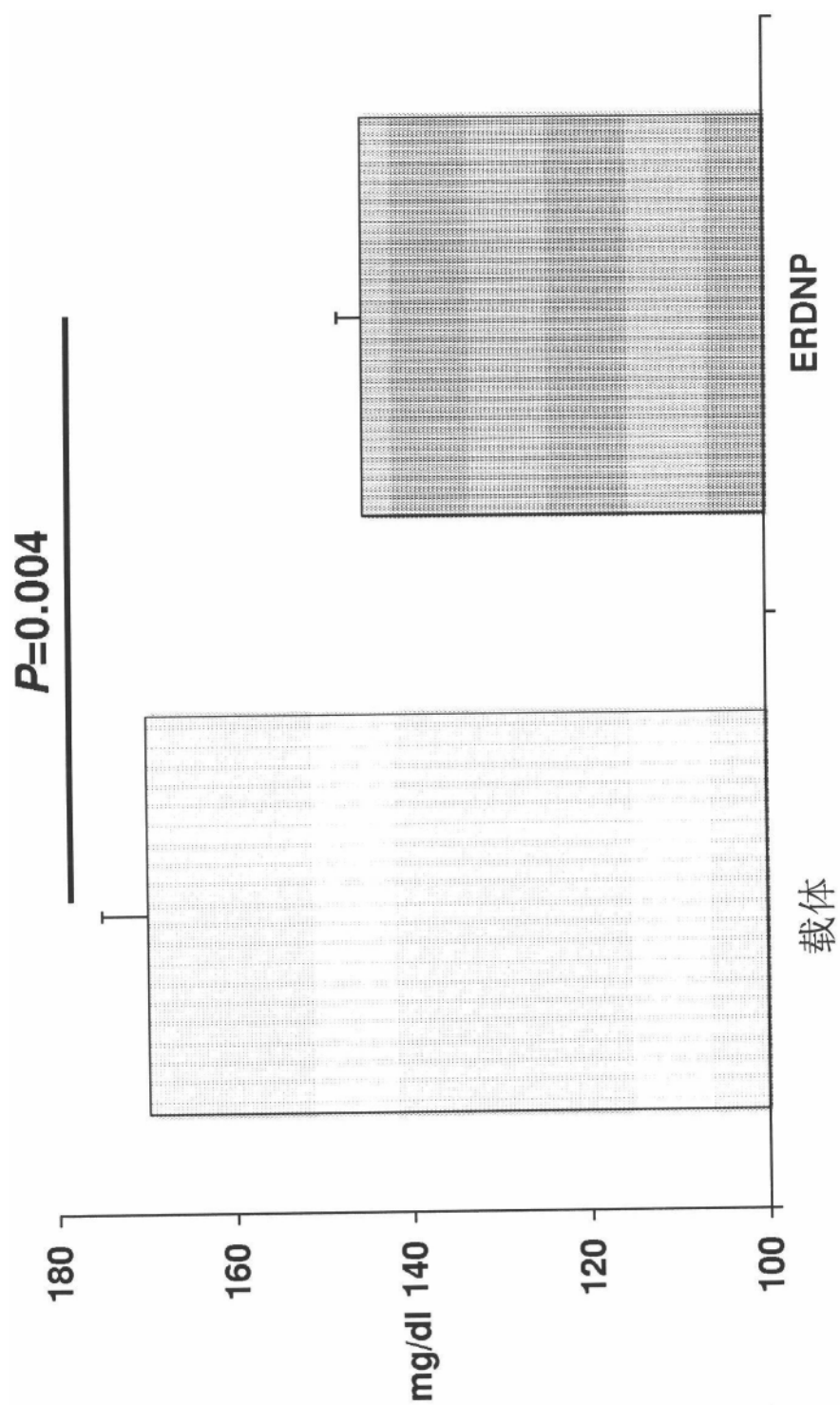


图10

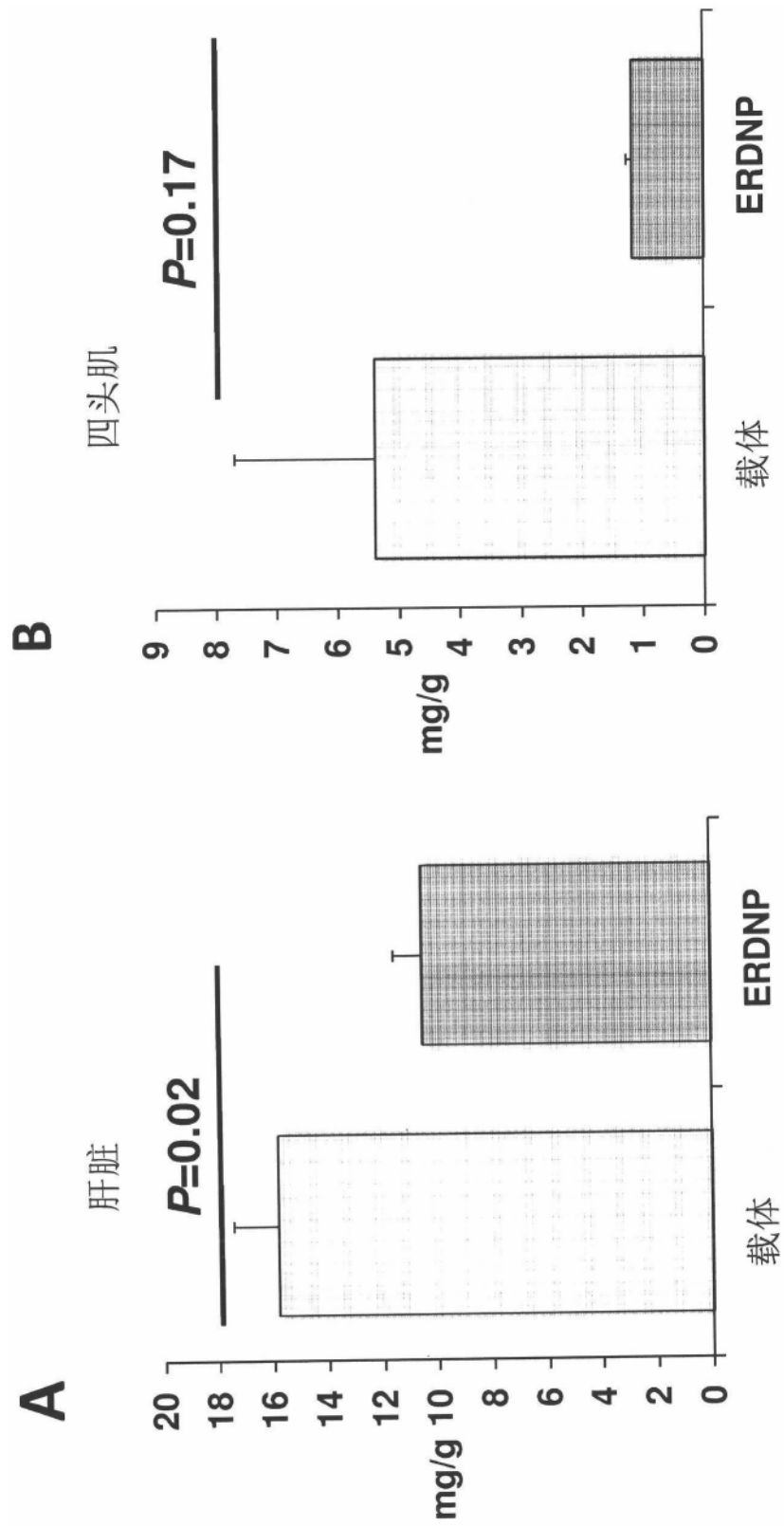


图11A-11B

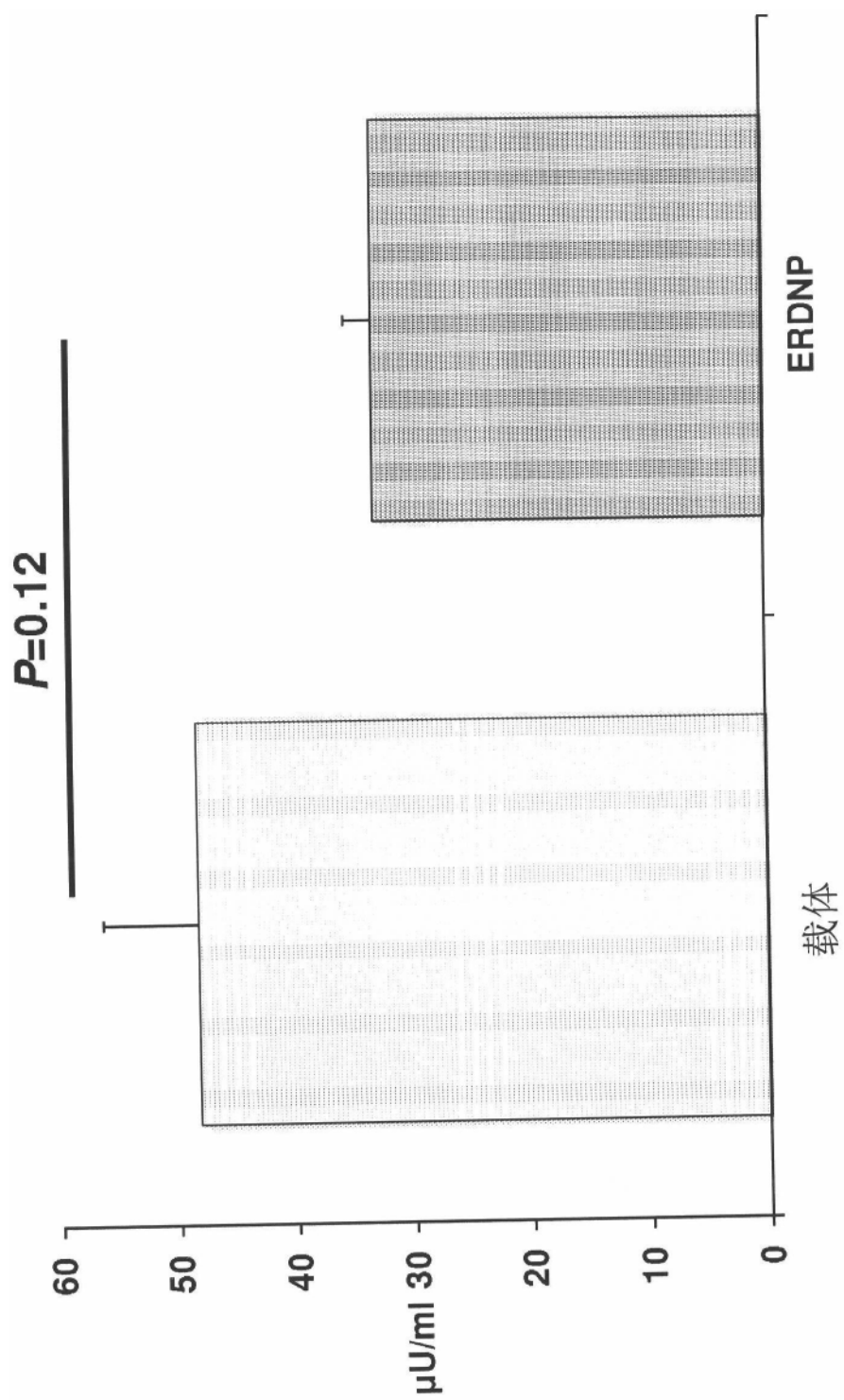


图12

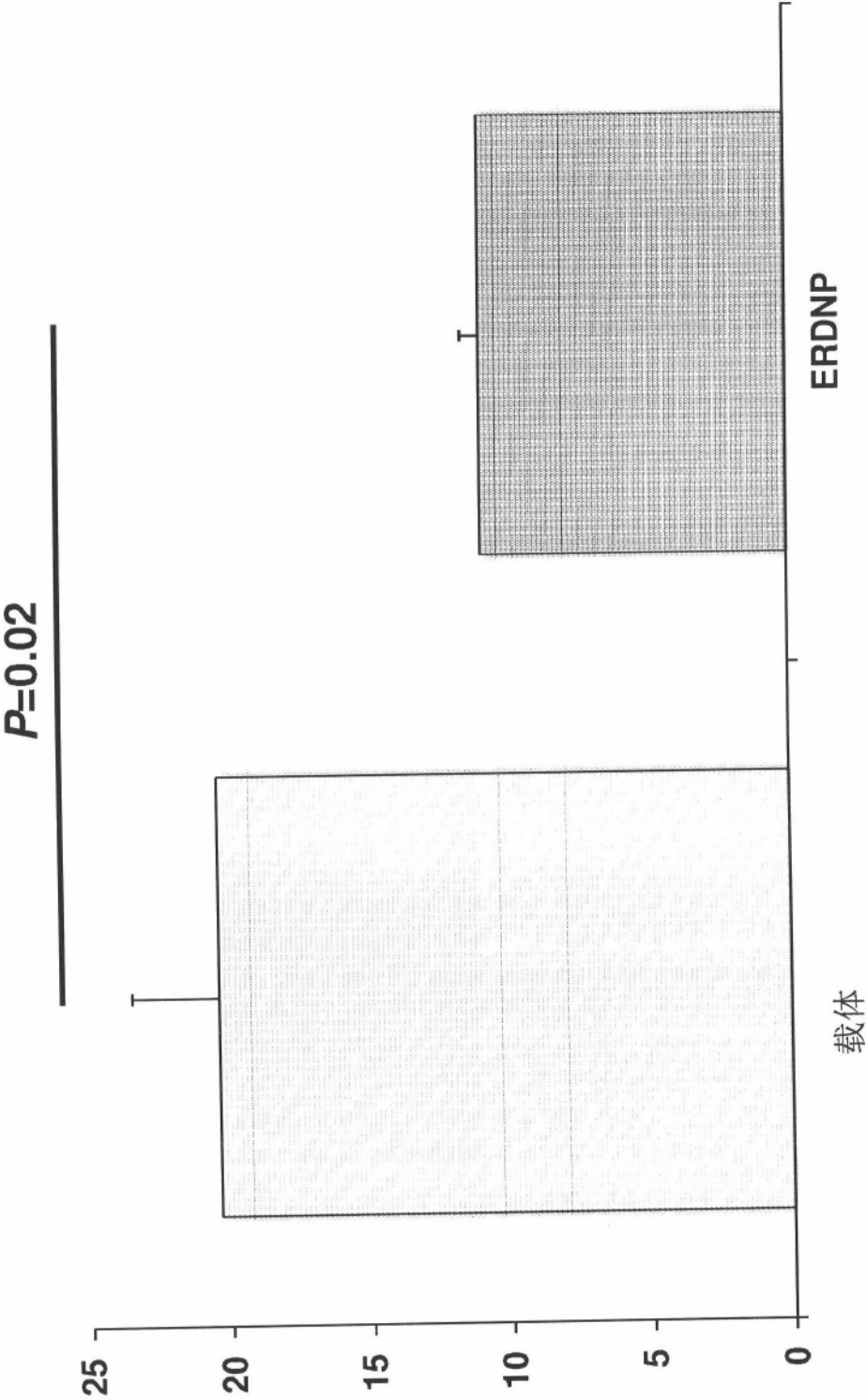


图13

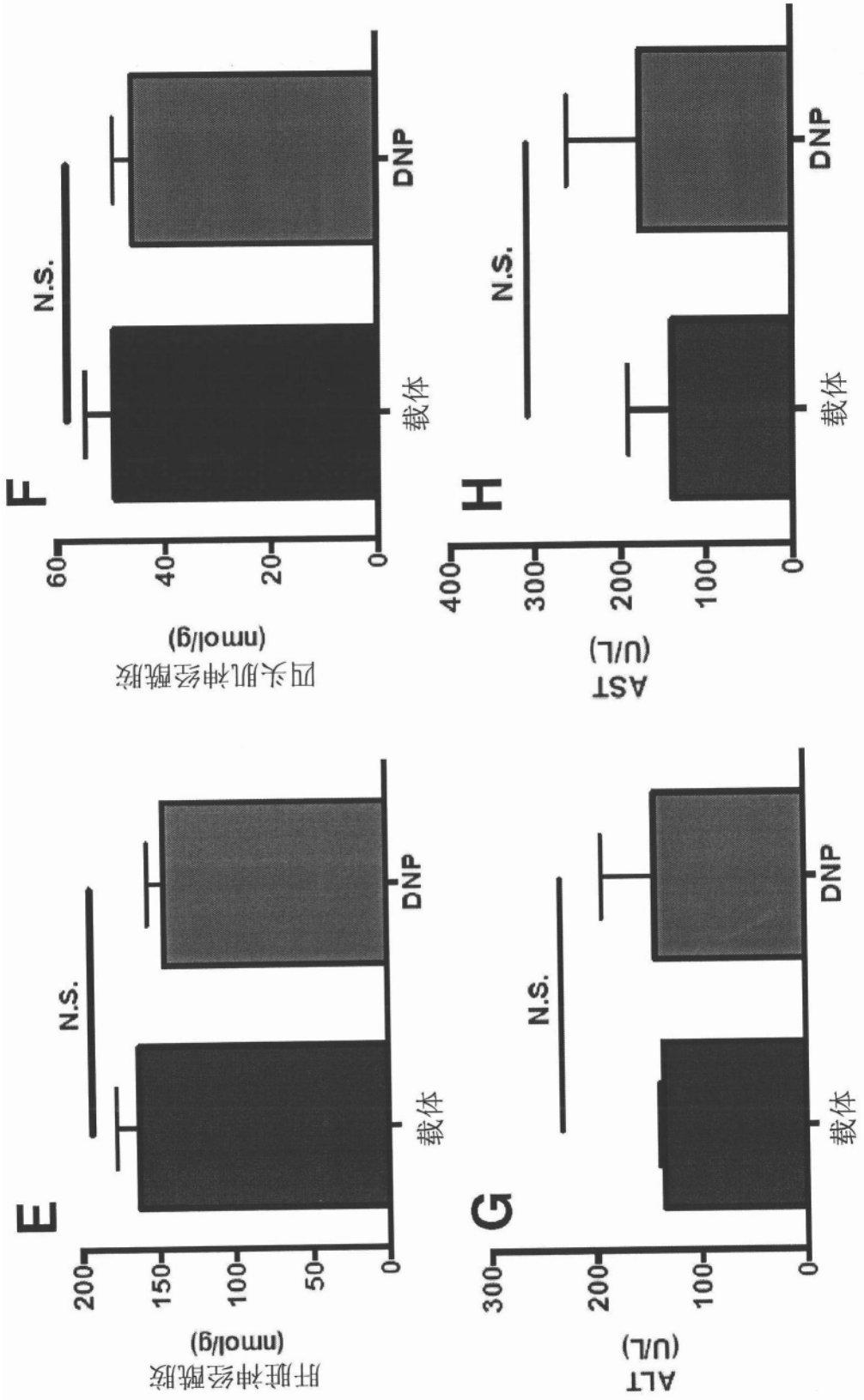


图14E-14H

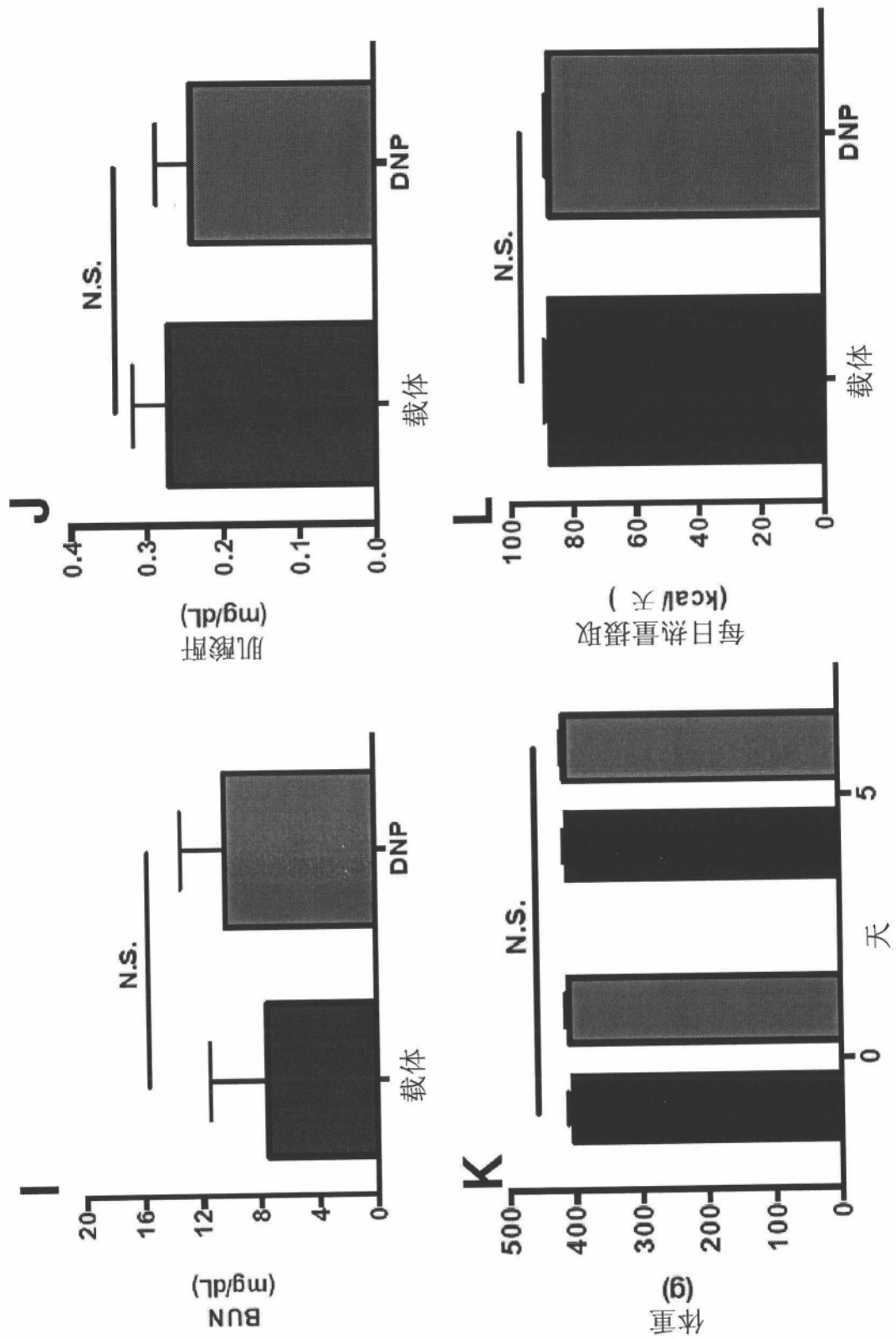


图14I-14L

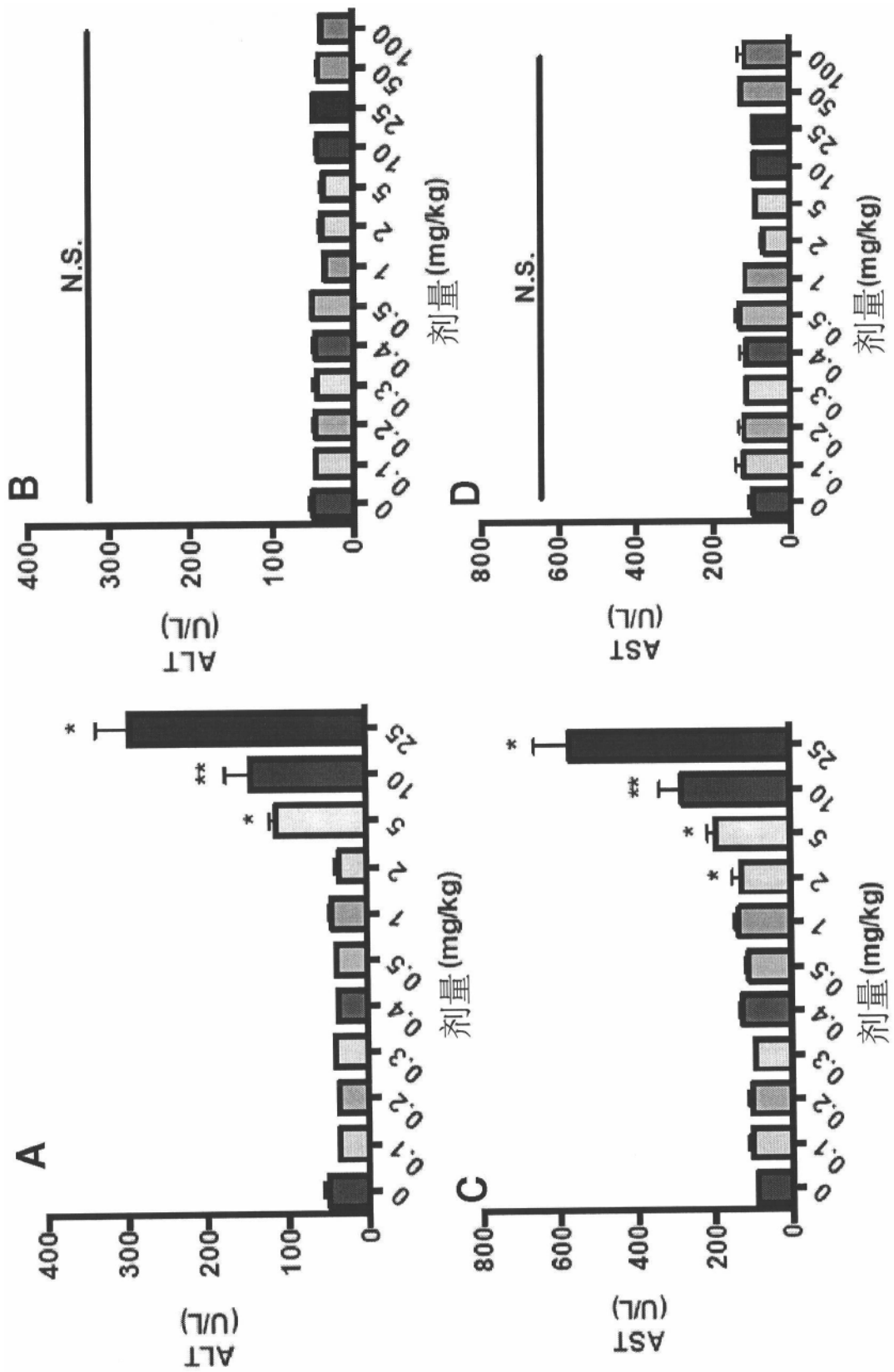


图15A-15D

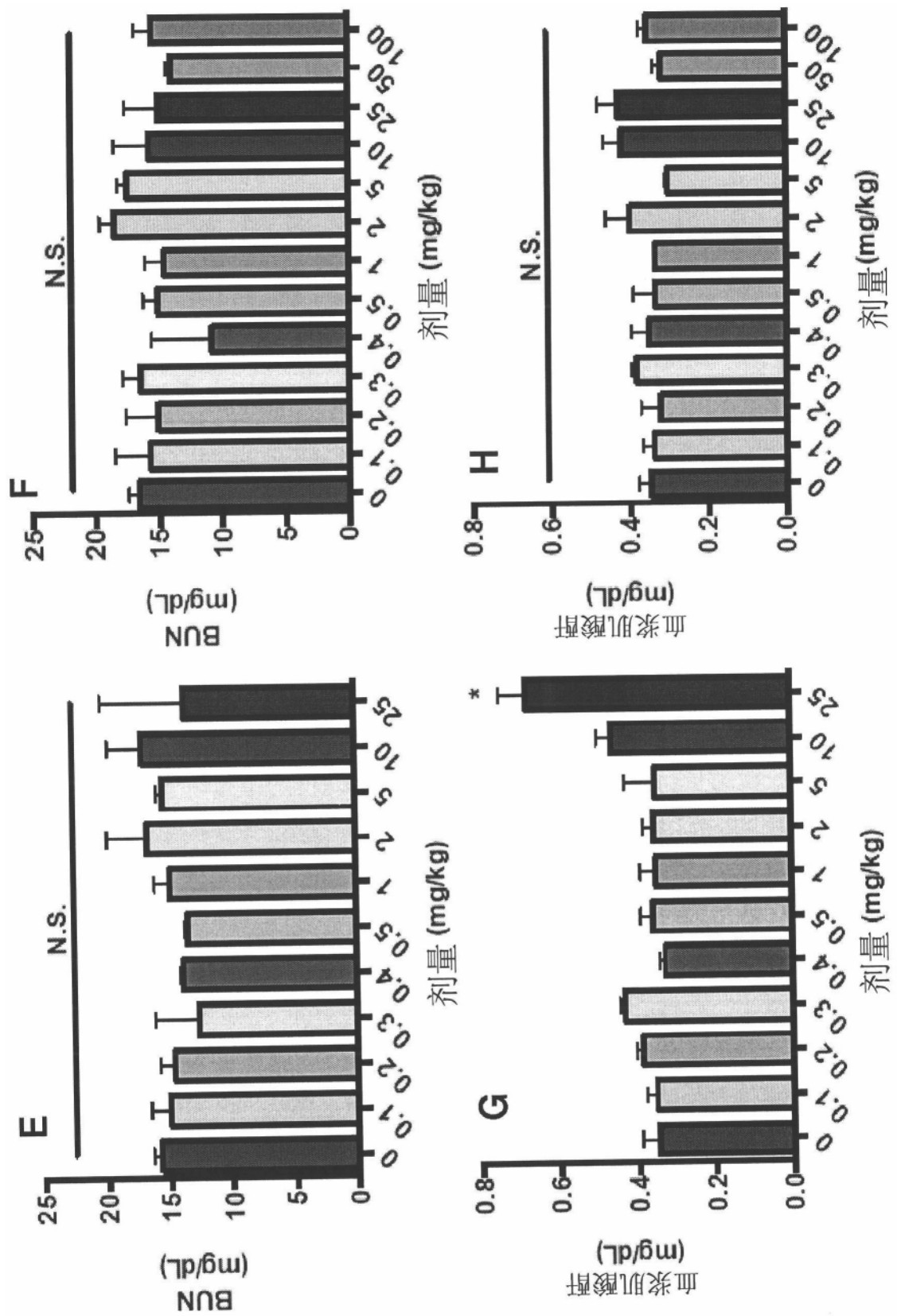


图15E-15H

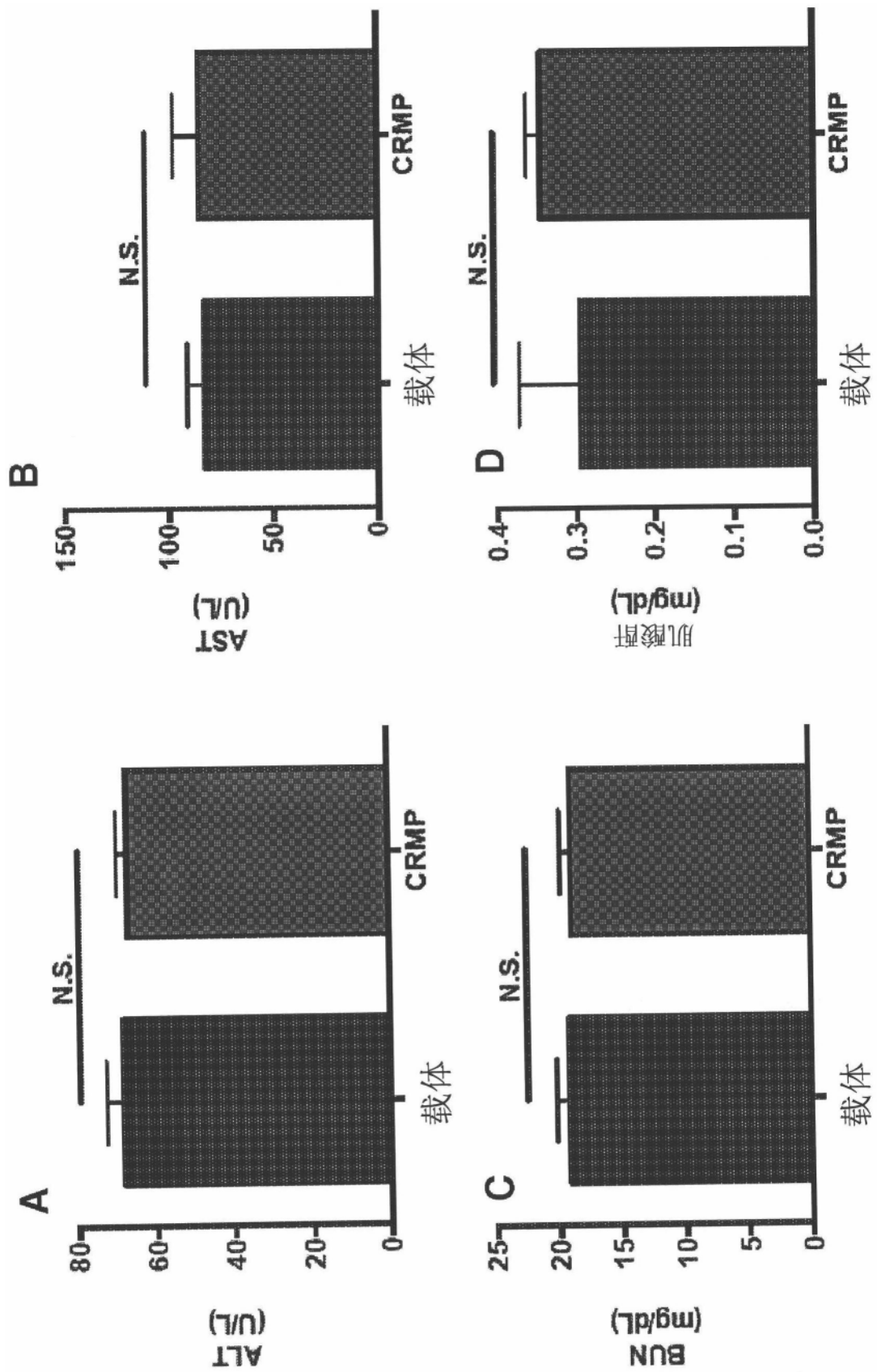


图16A-16D

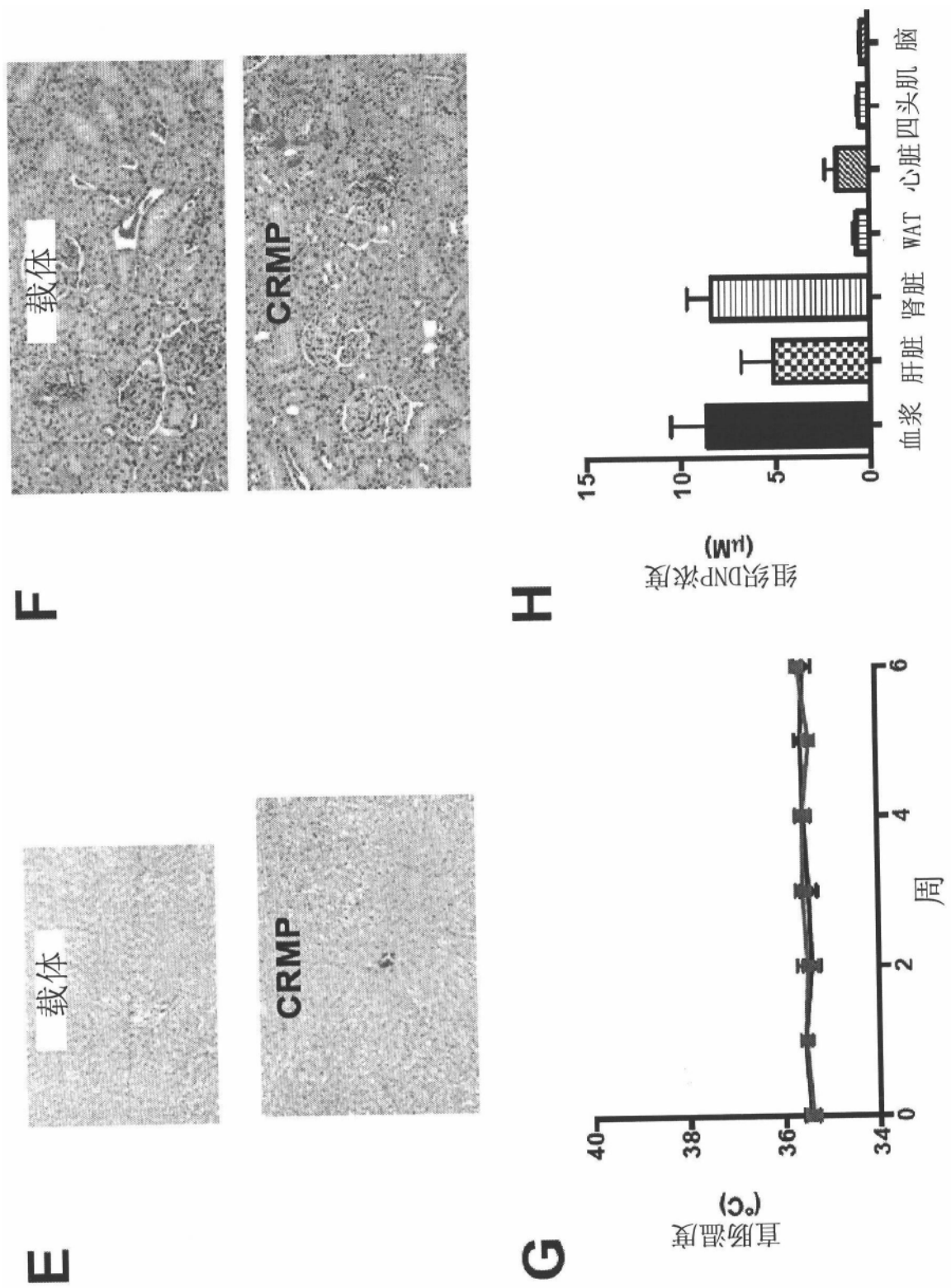


图16E-16H

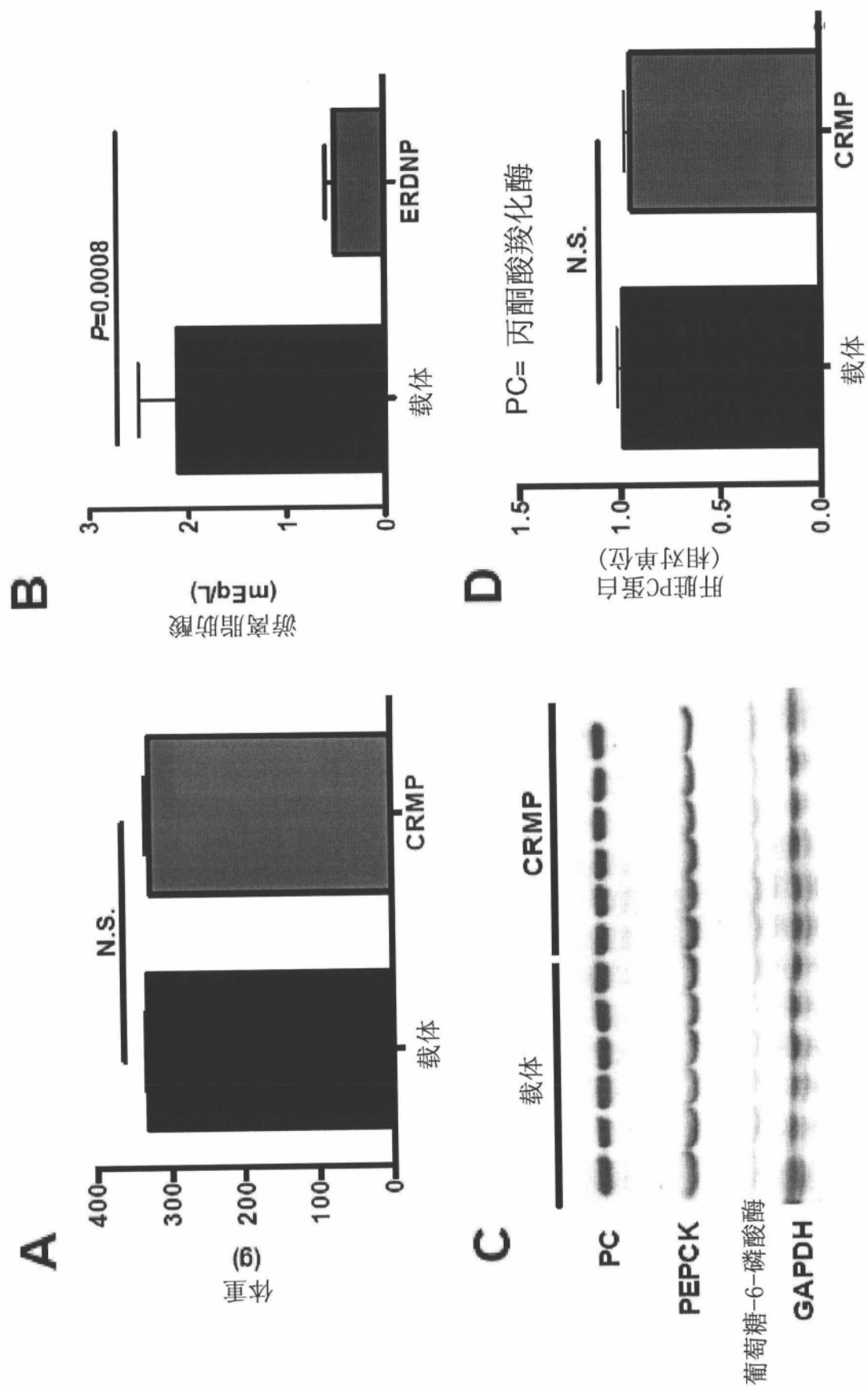


图17A-17D

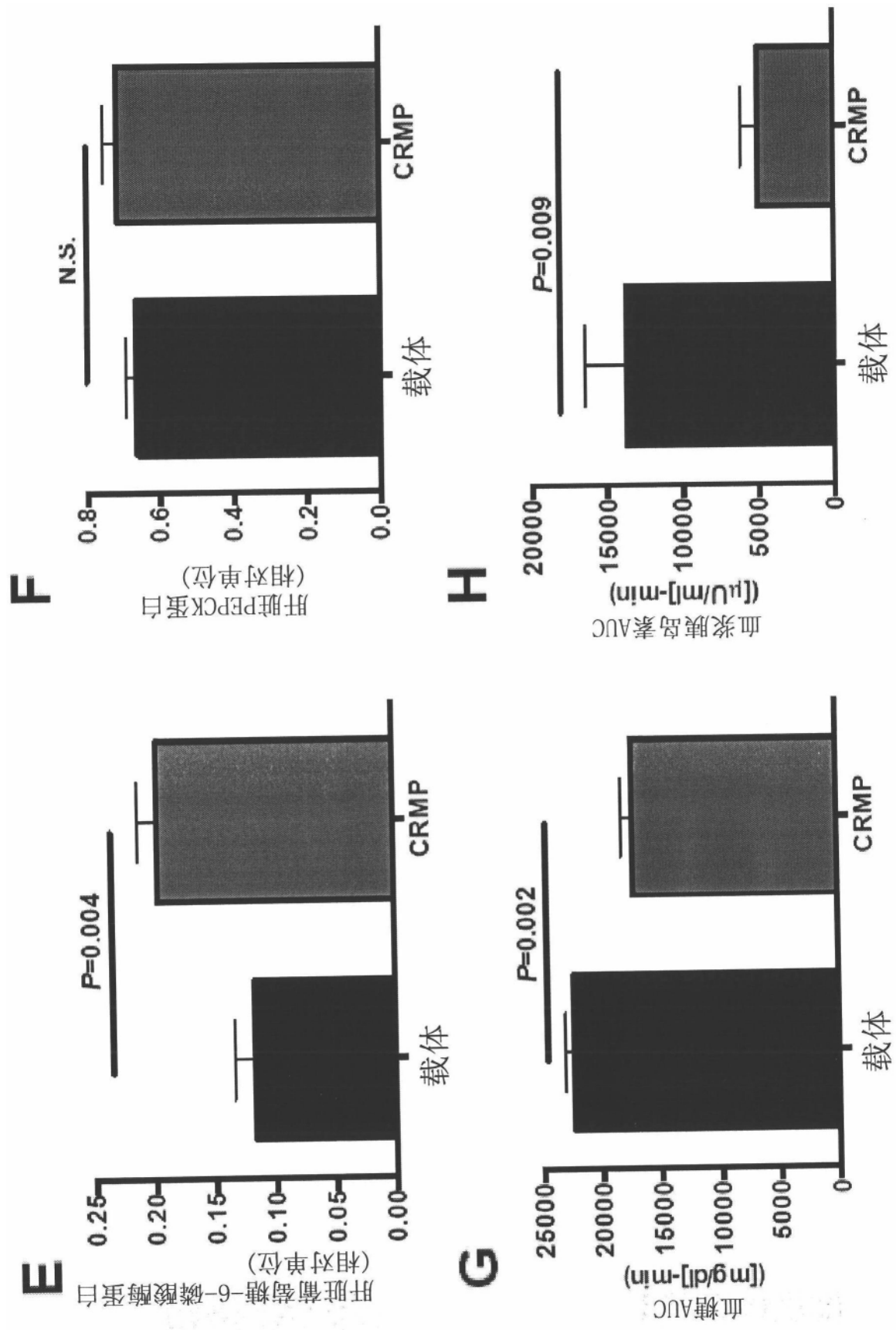


图17E-17H

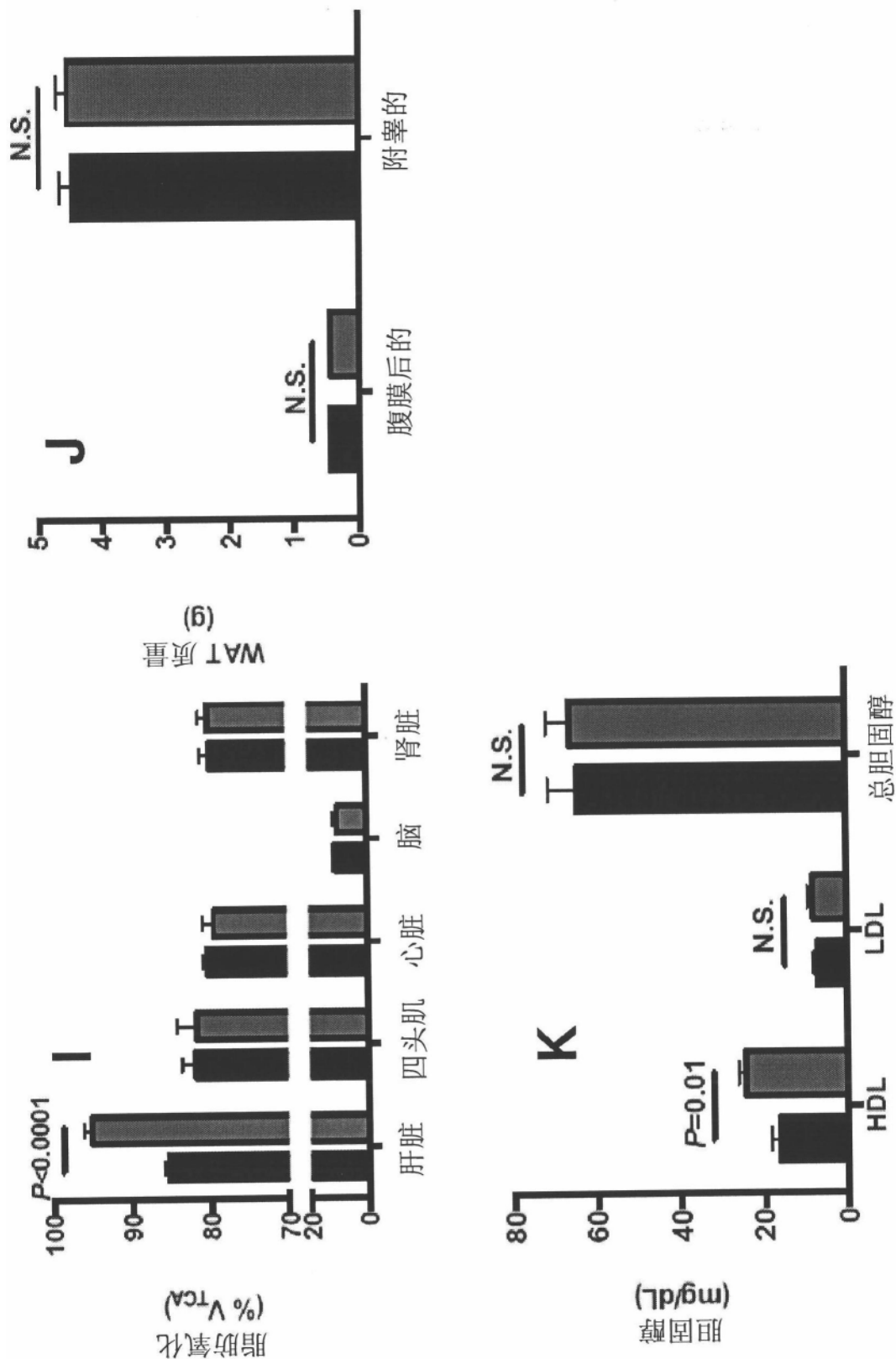


图17I-17K

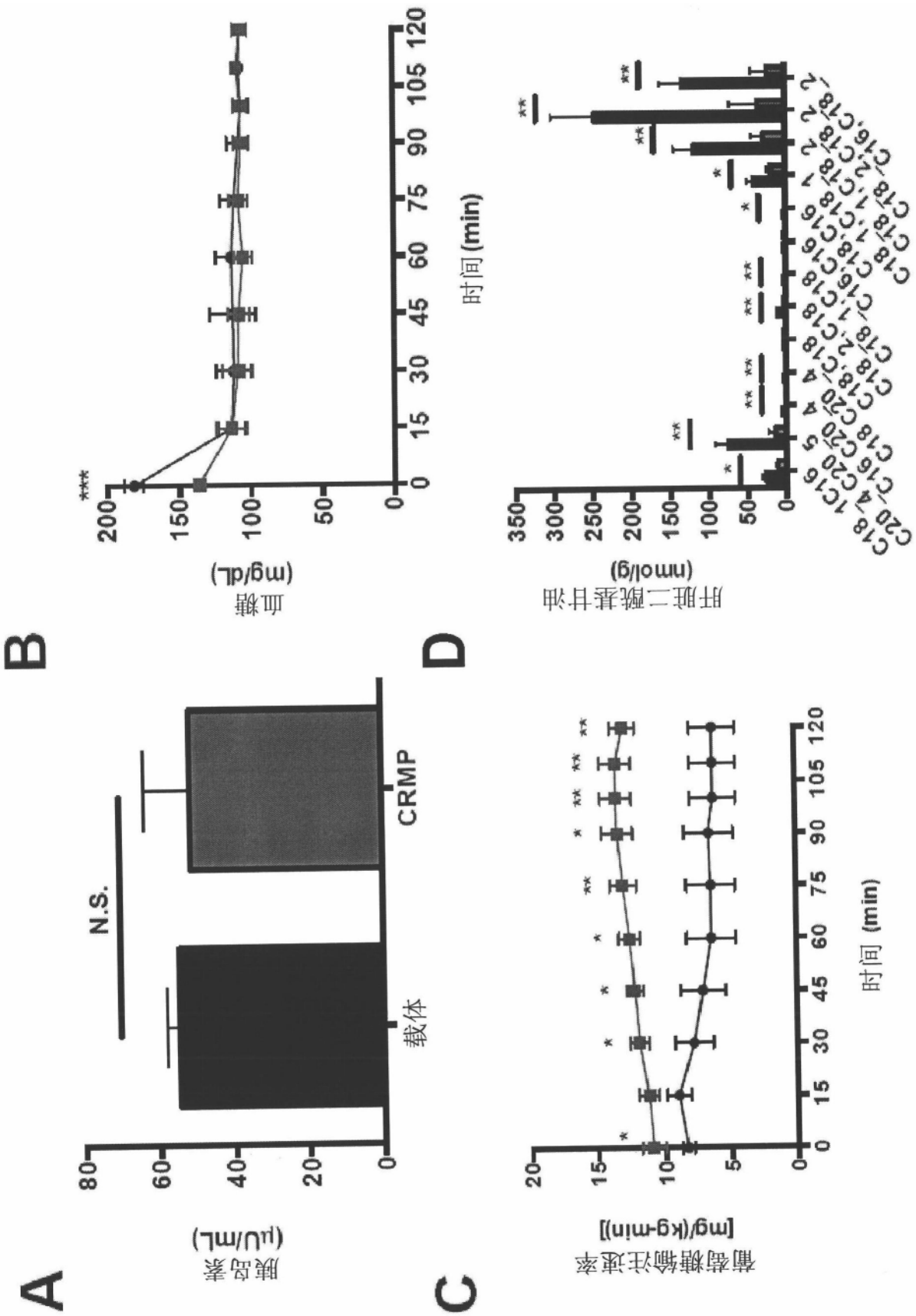


图18A-18D

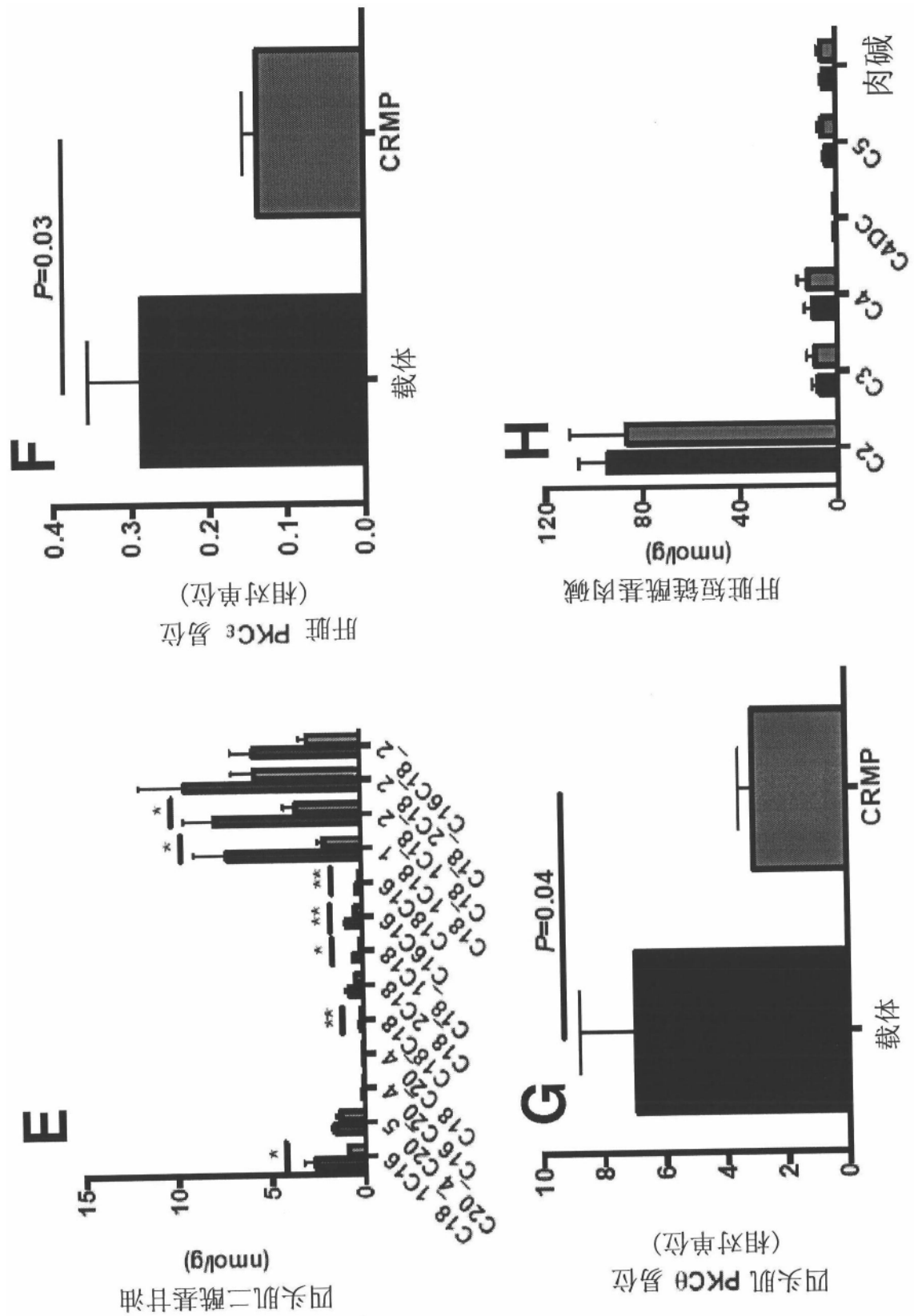


图18E-18H

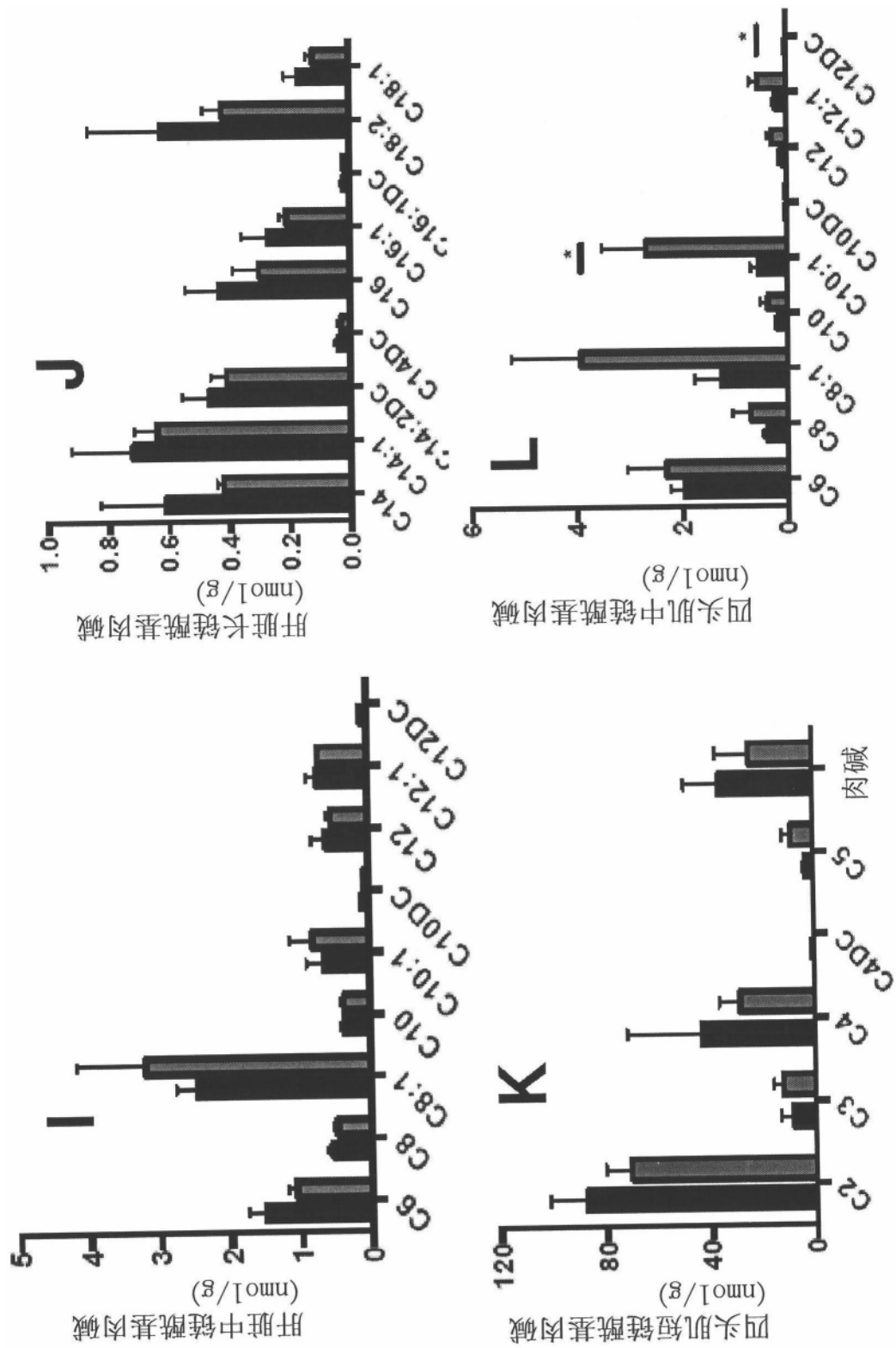


图18I-18L

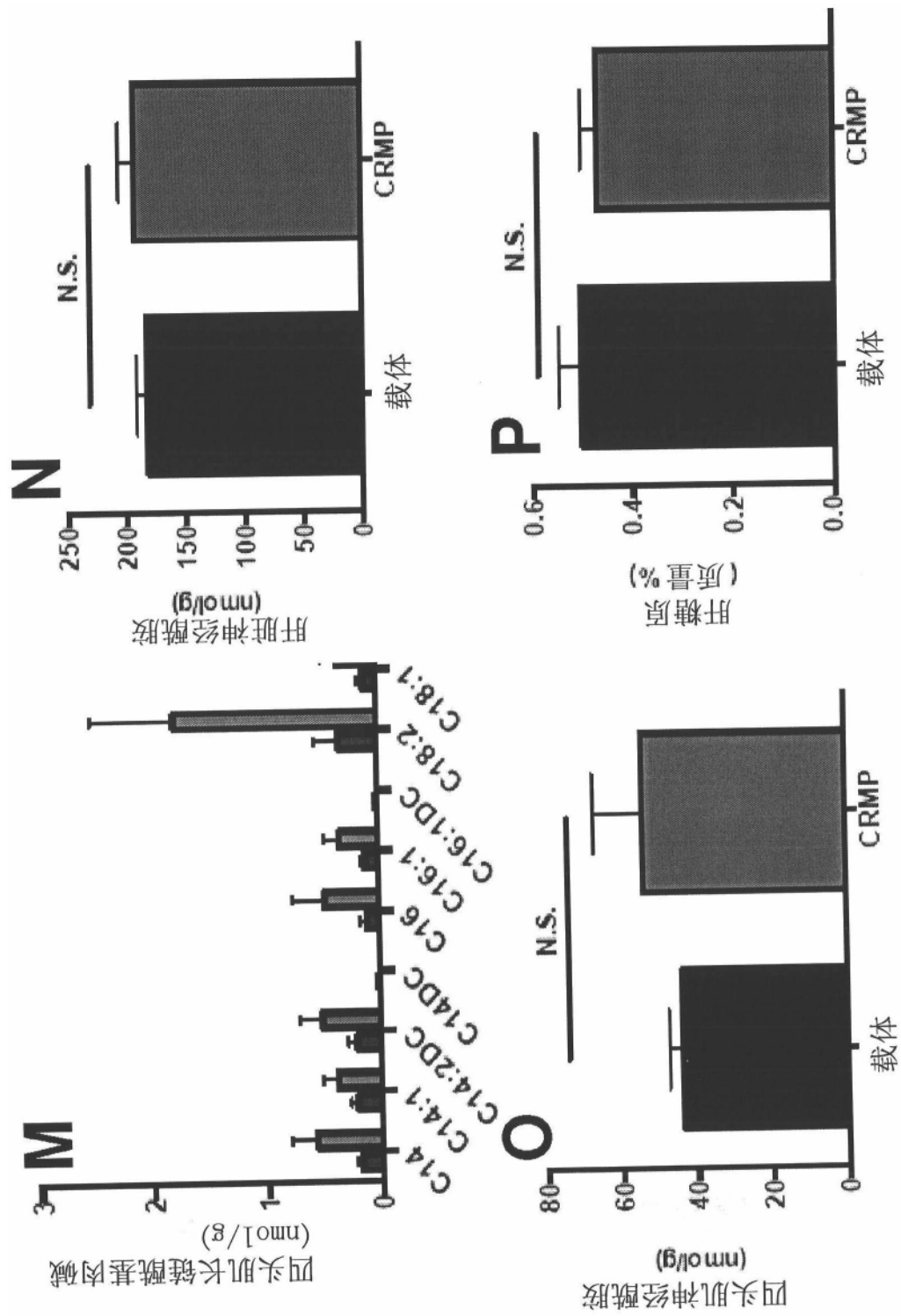


图18M-18P

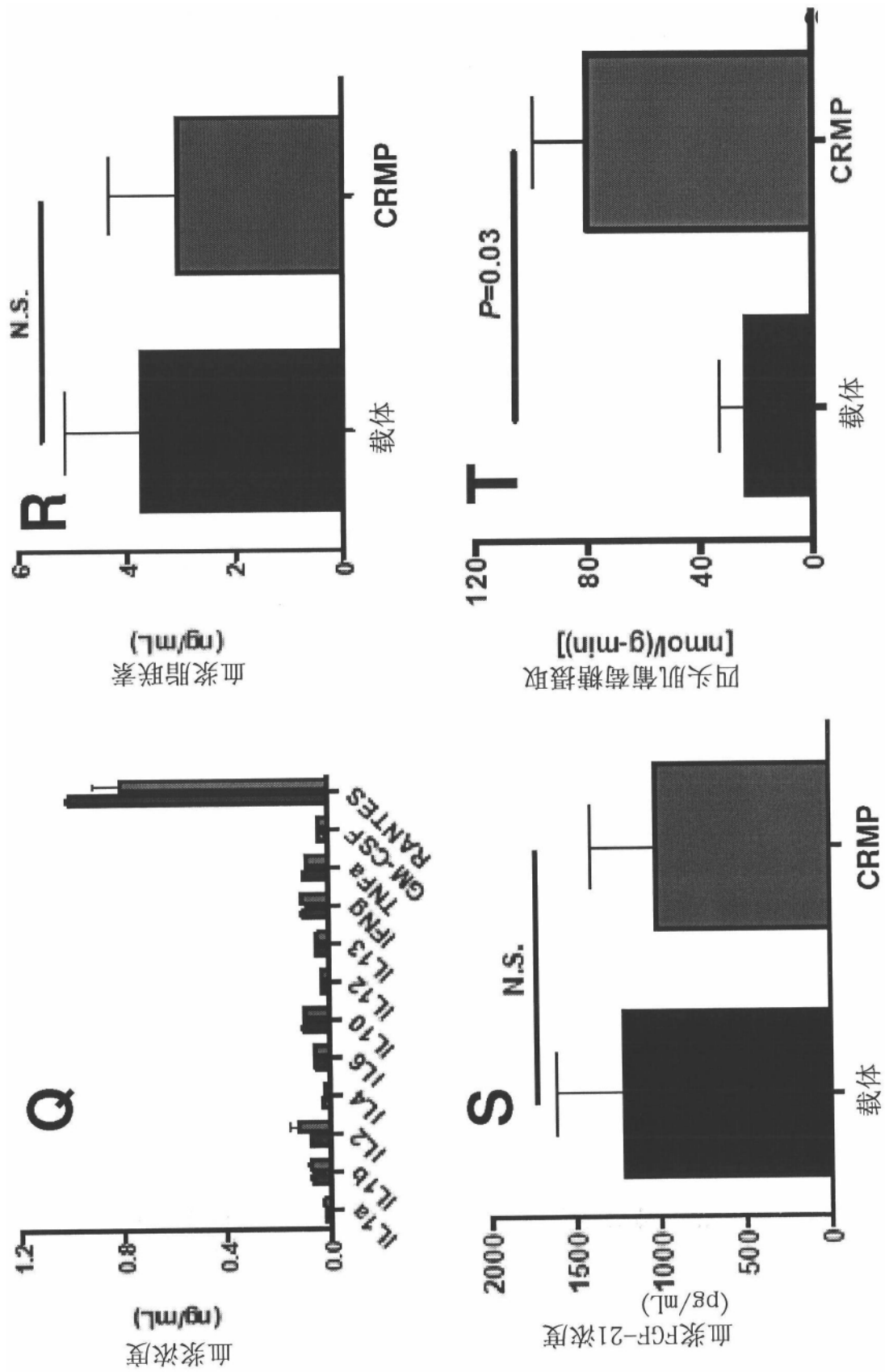


图18Q-18T

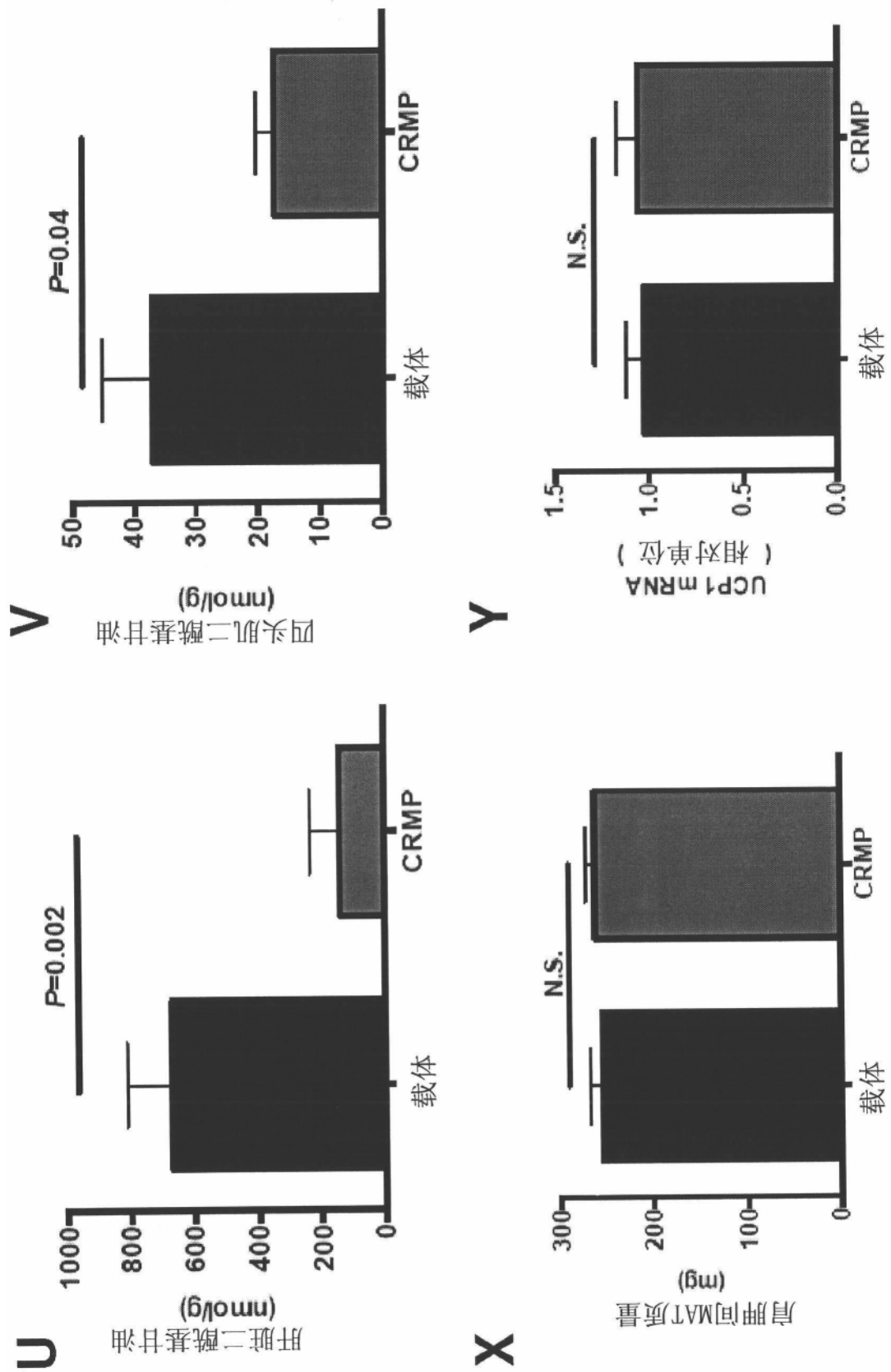


图18U-18Y

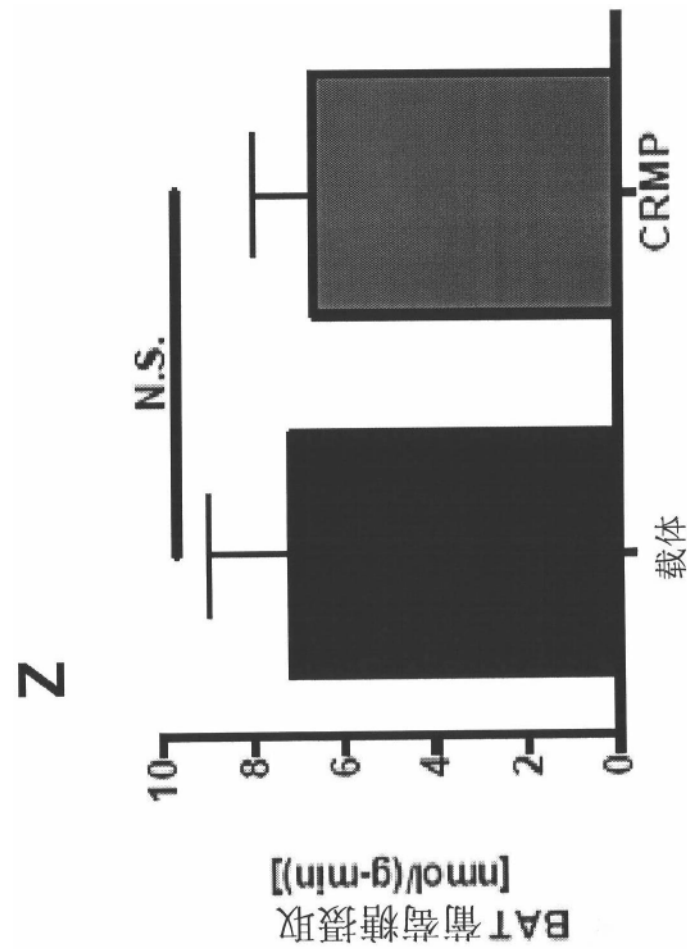


图18Z

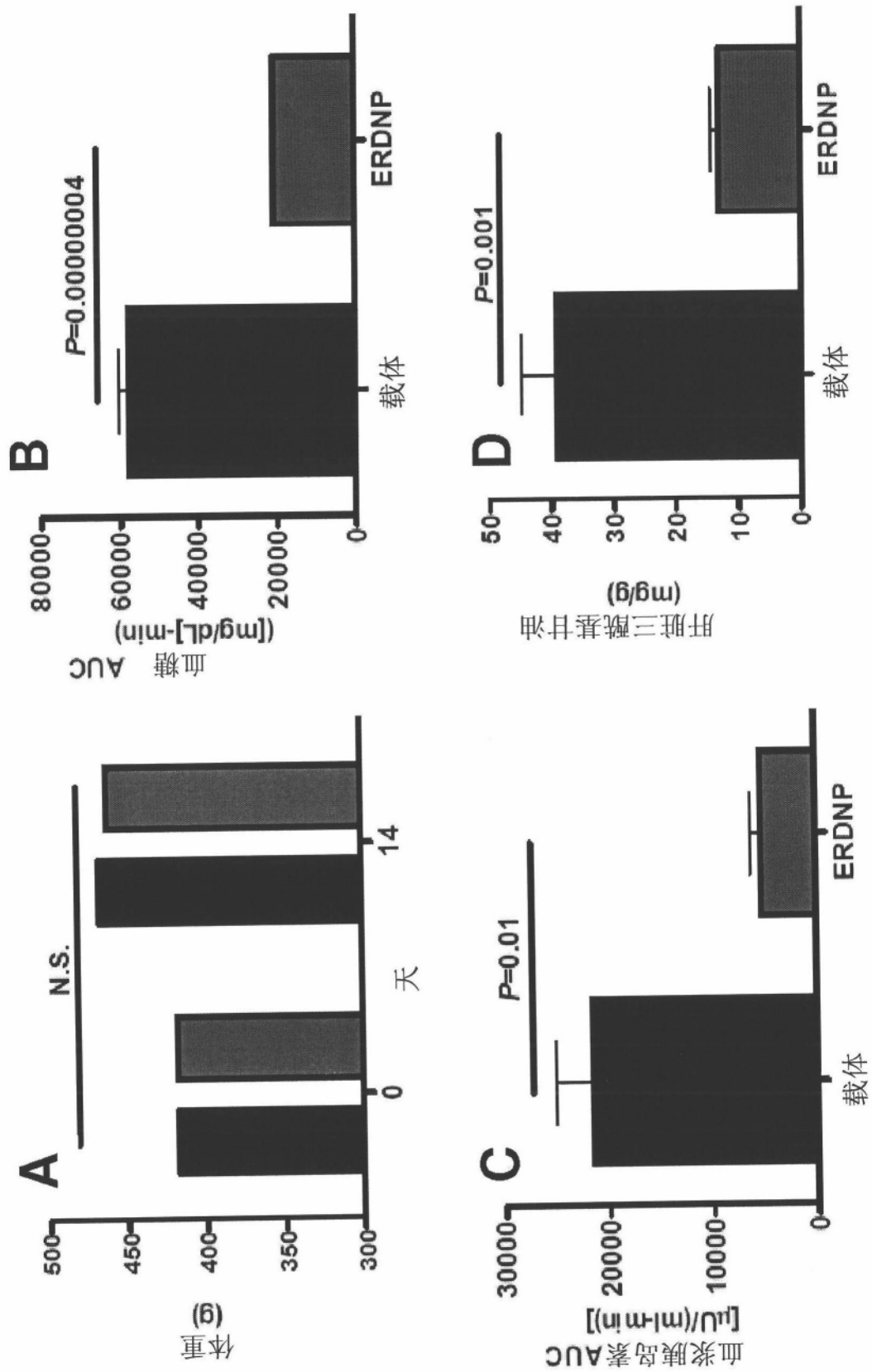


图19A-19D

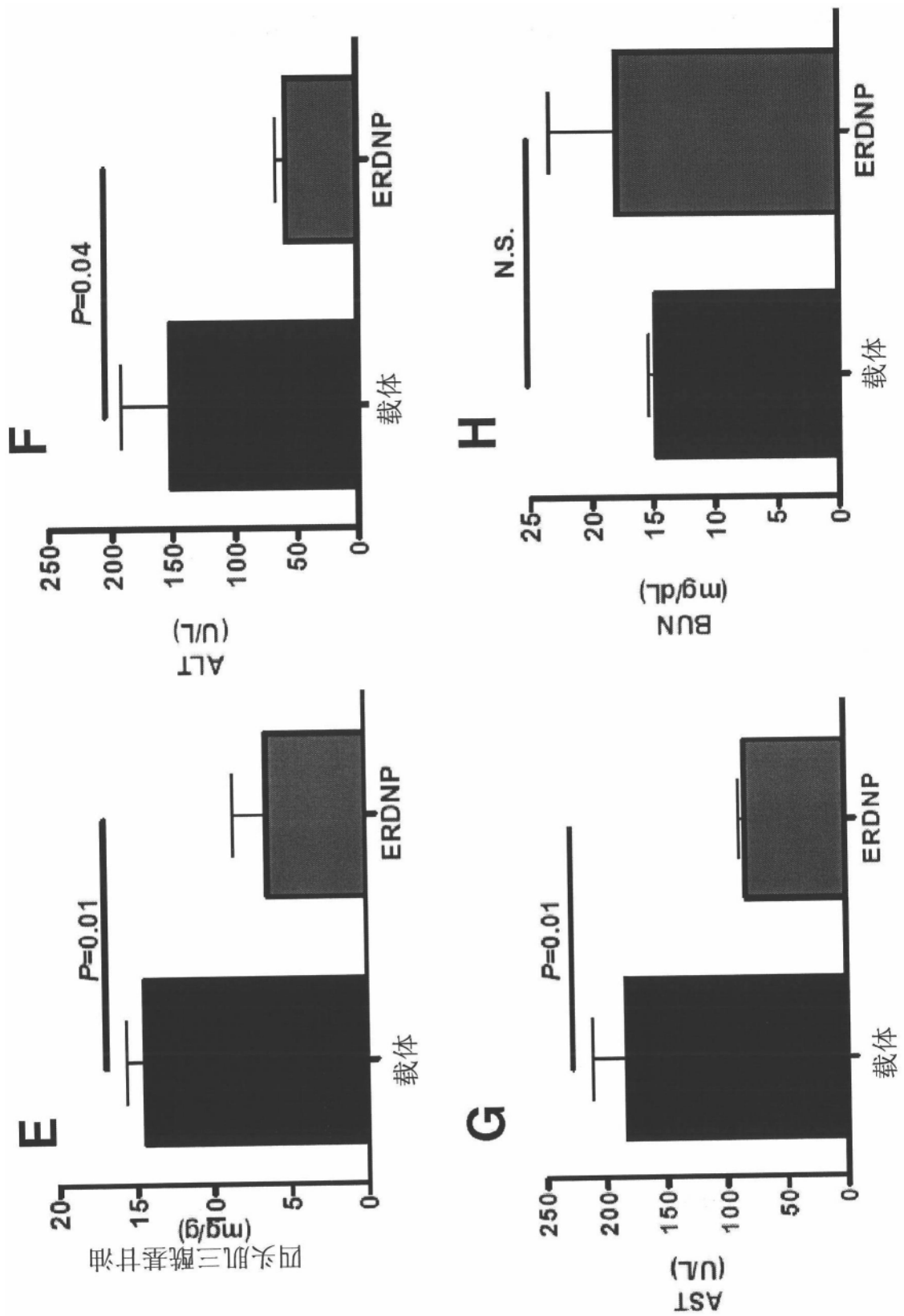


图19E-19H

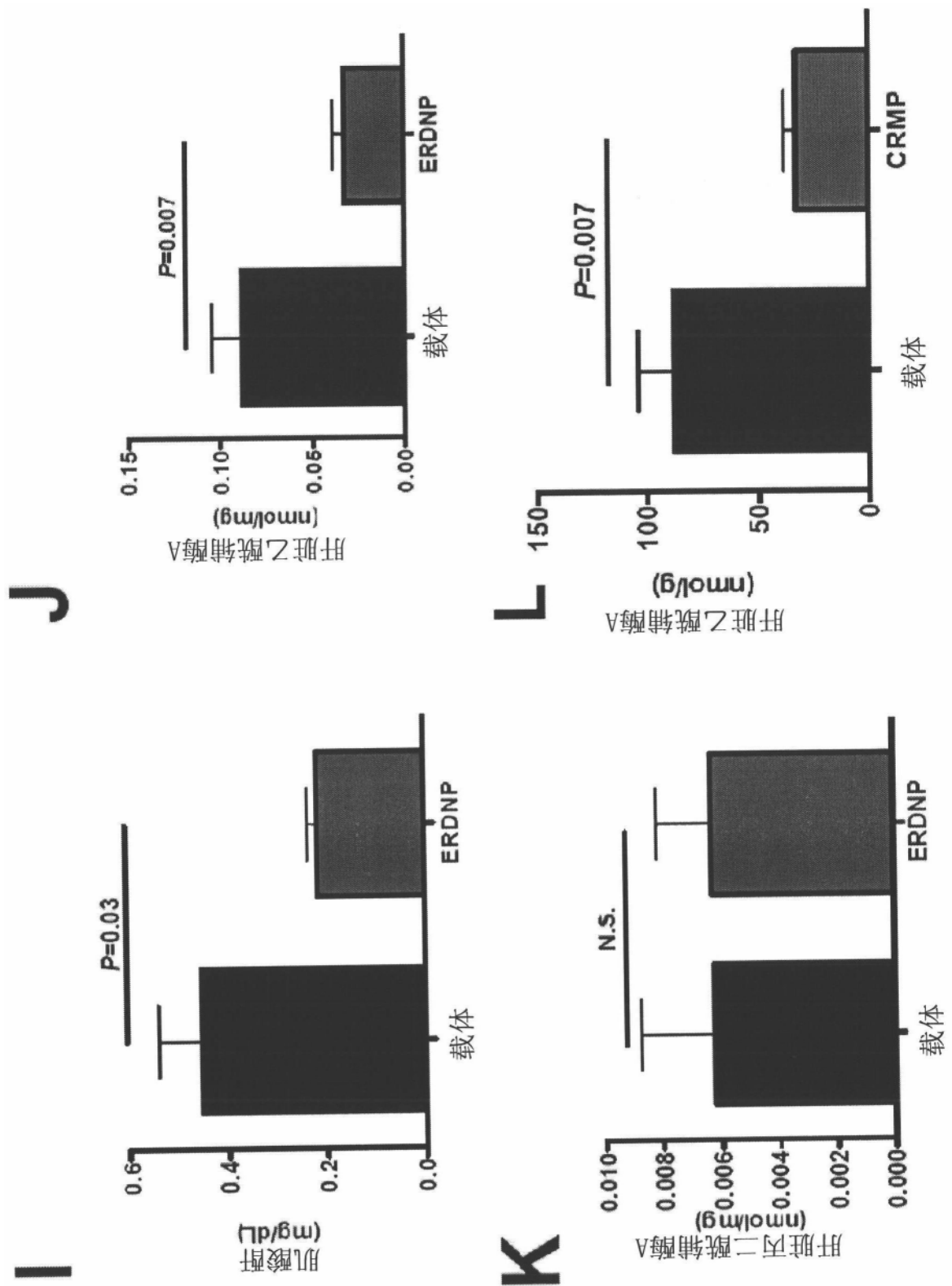


图19I-19L

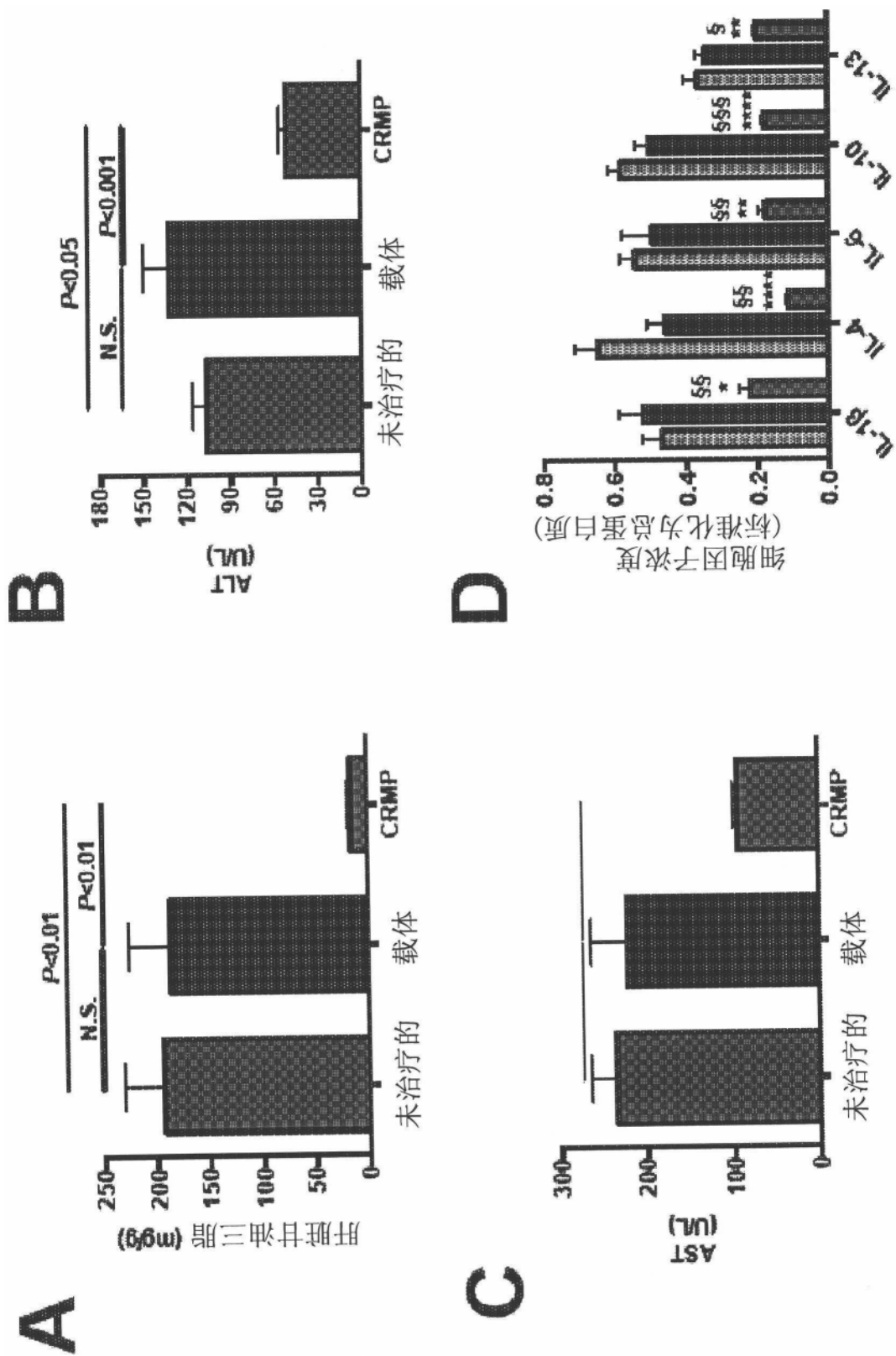


图20A-20F

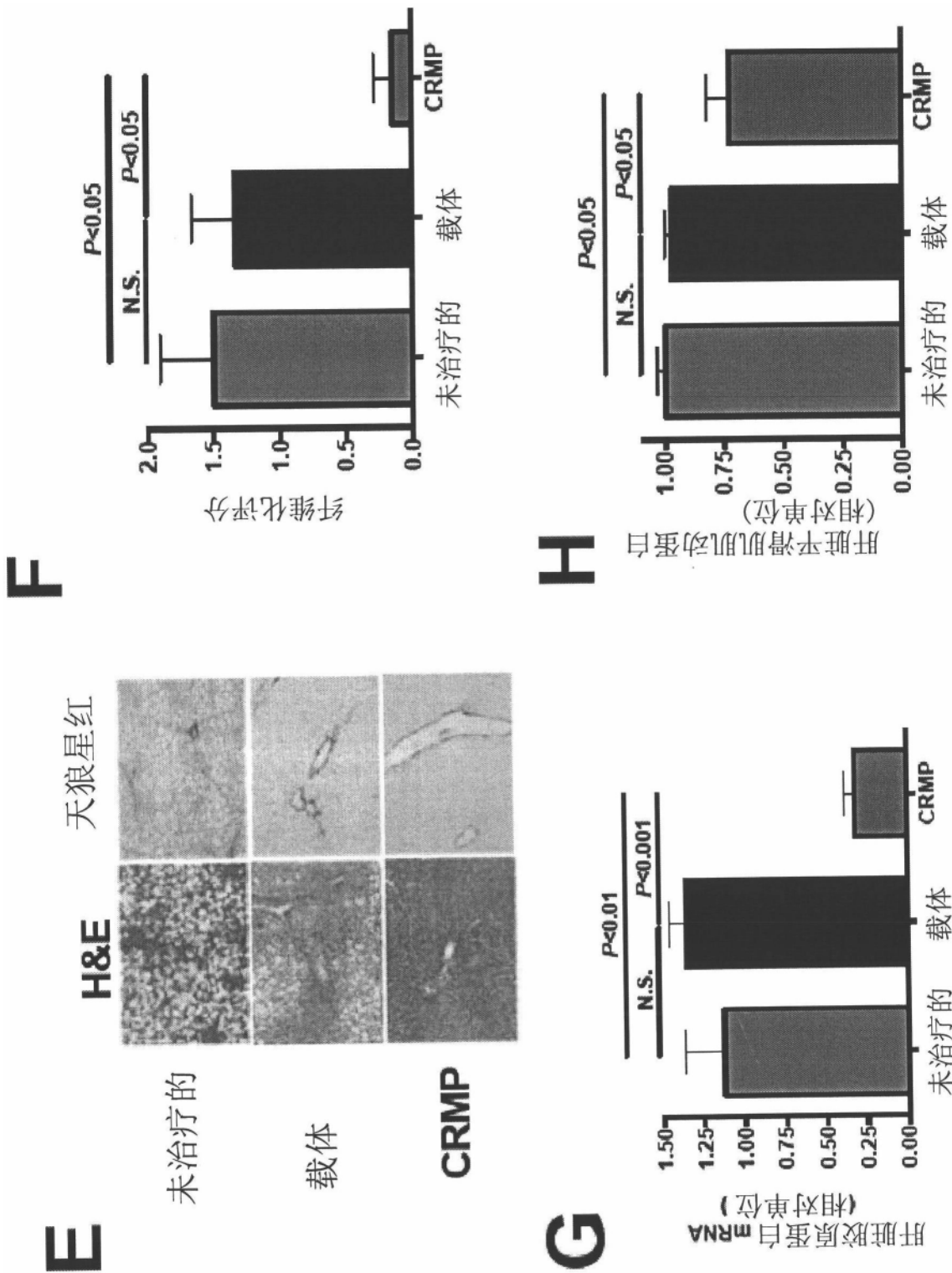


图20E-20H

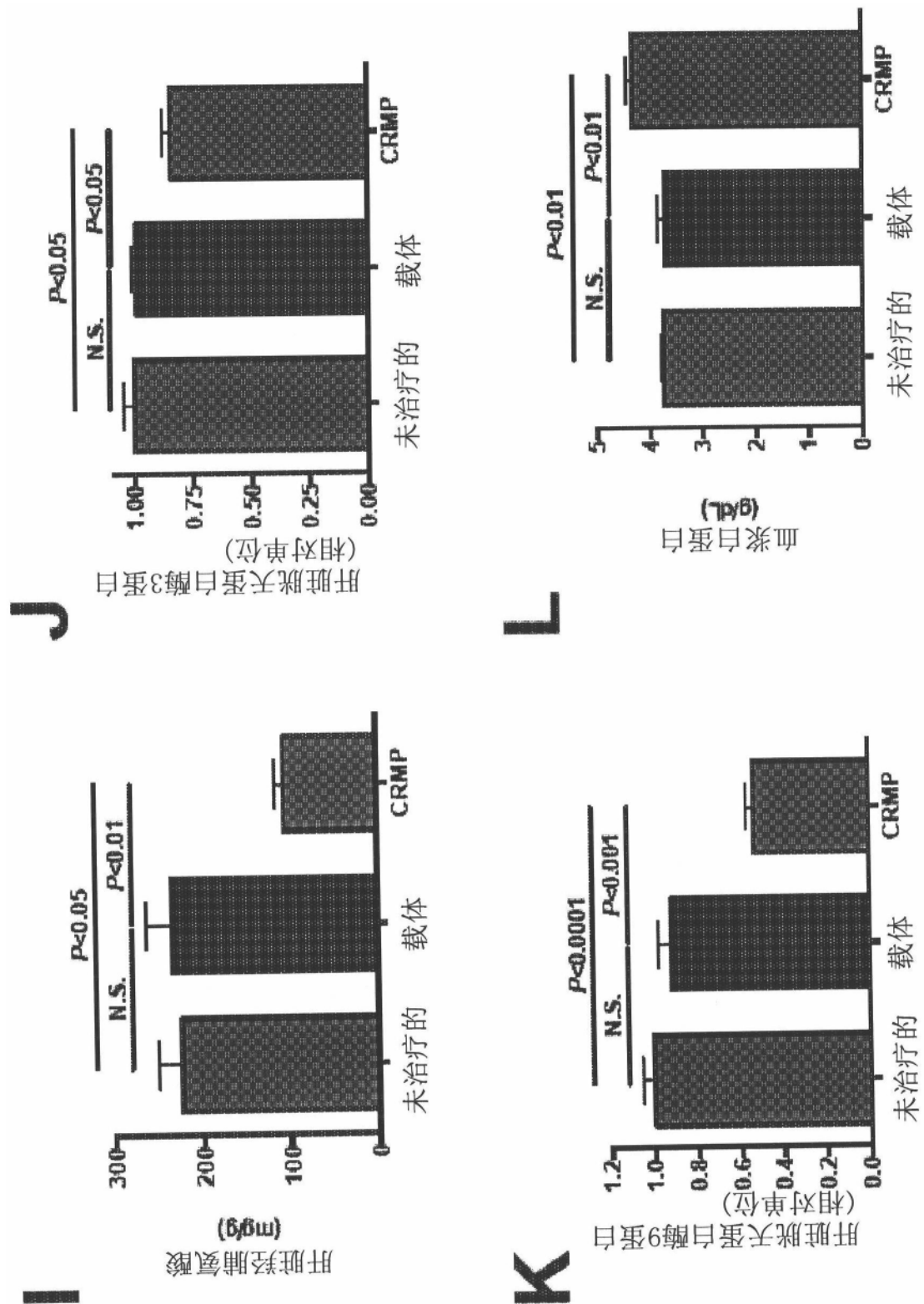


图20I-20L

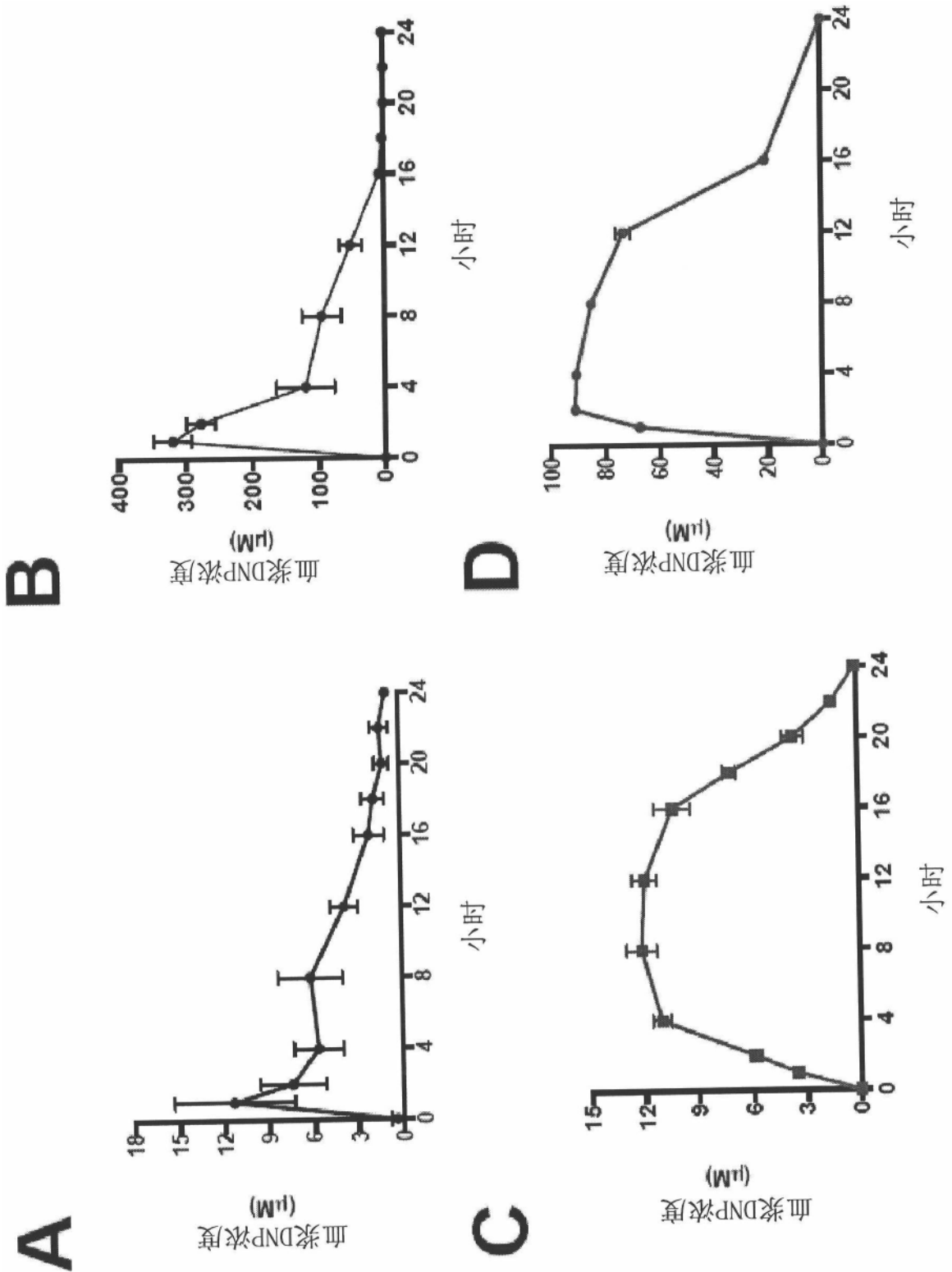


图21A-21D

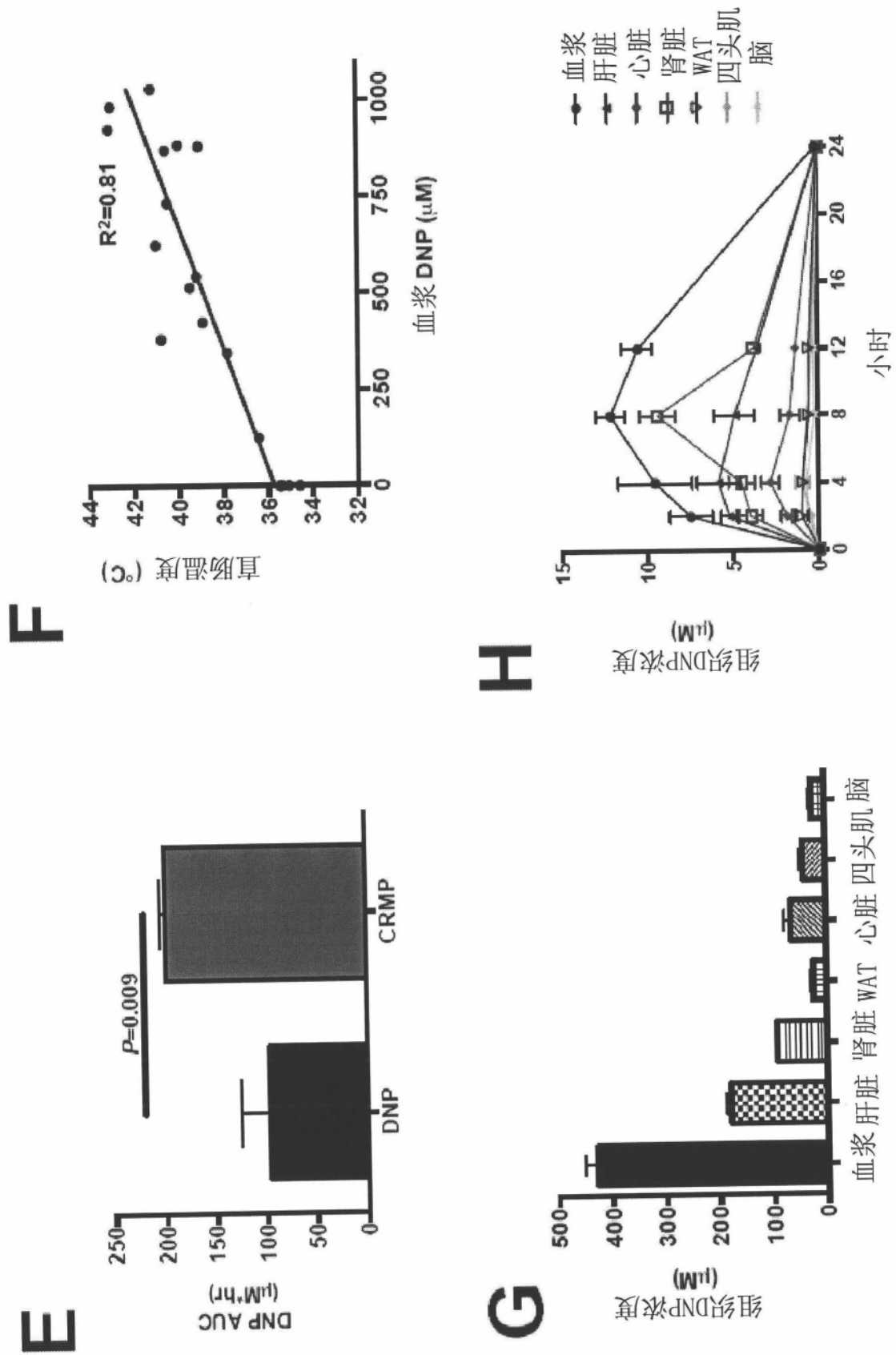


图21E-21H

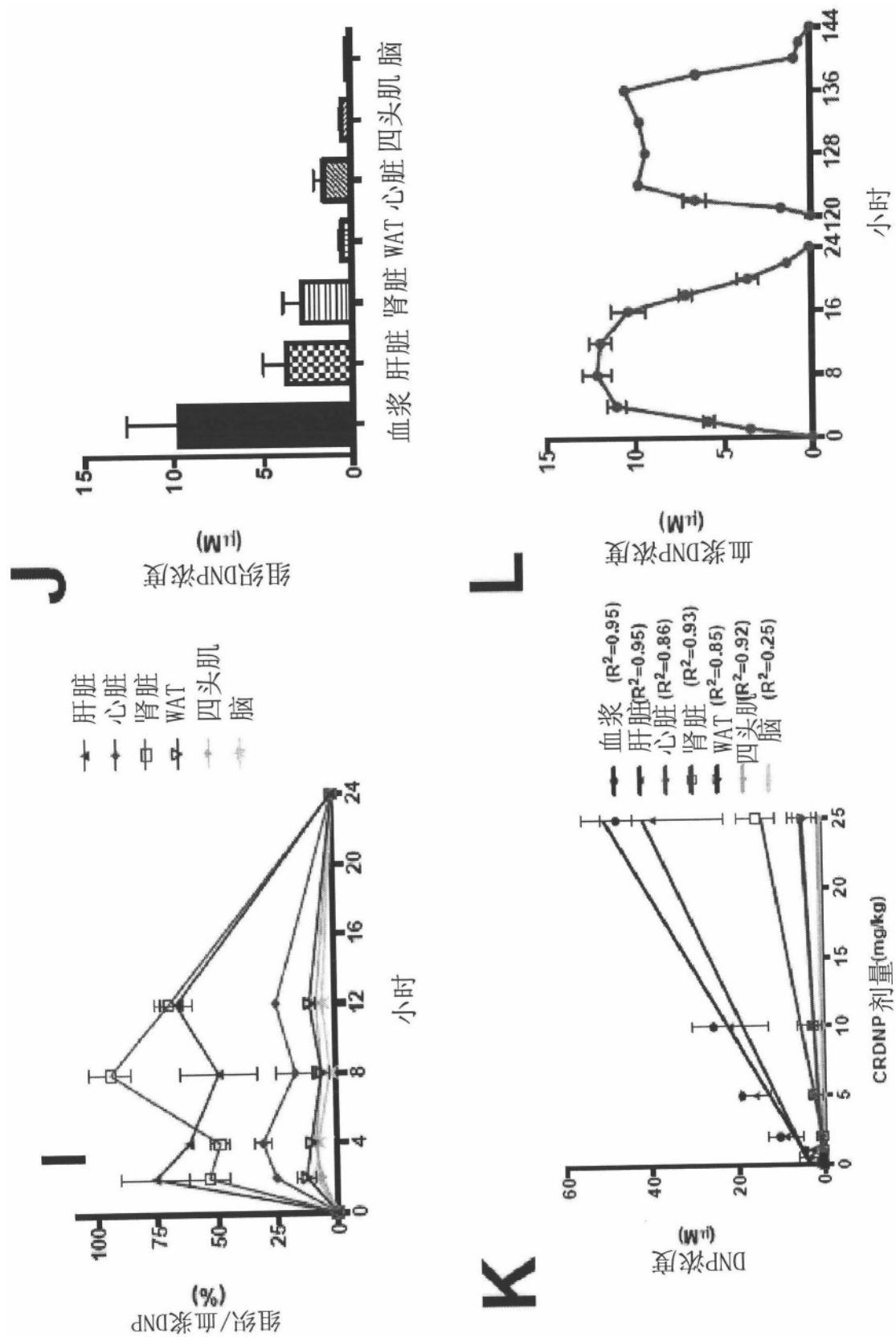


图21I-21L

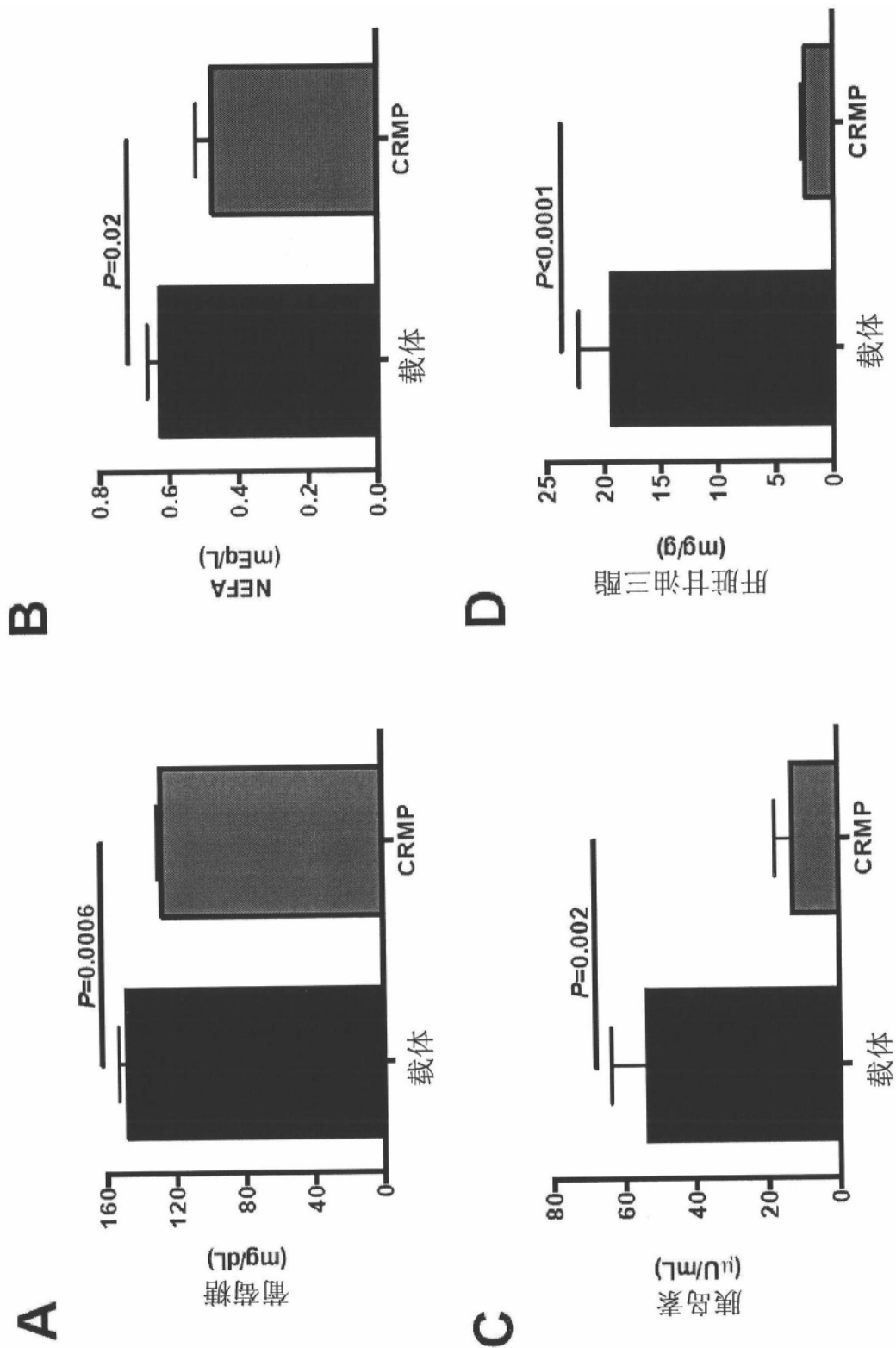


图22A-22D

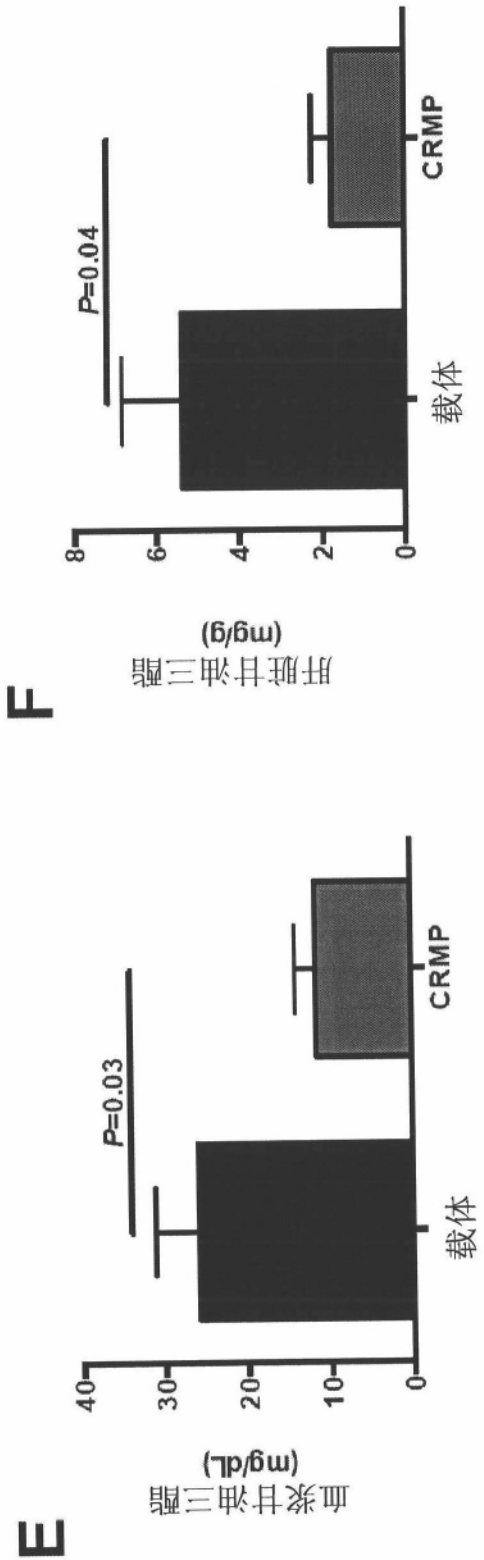


图22E-22F

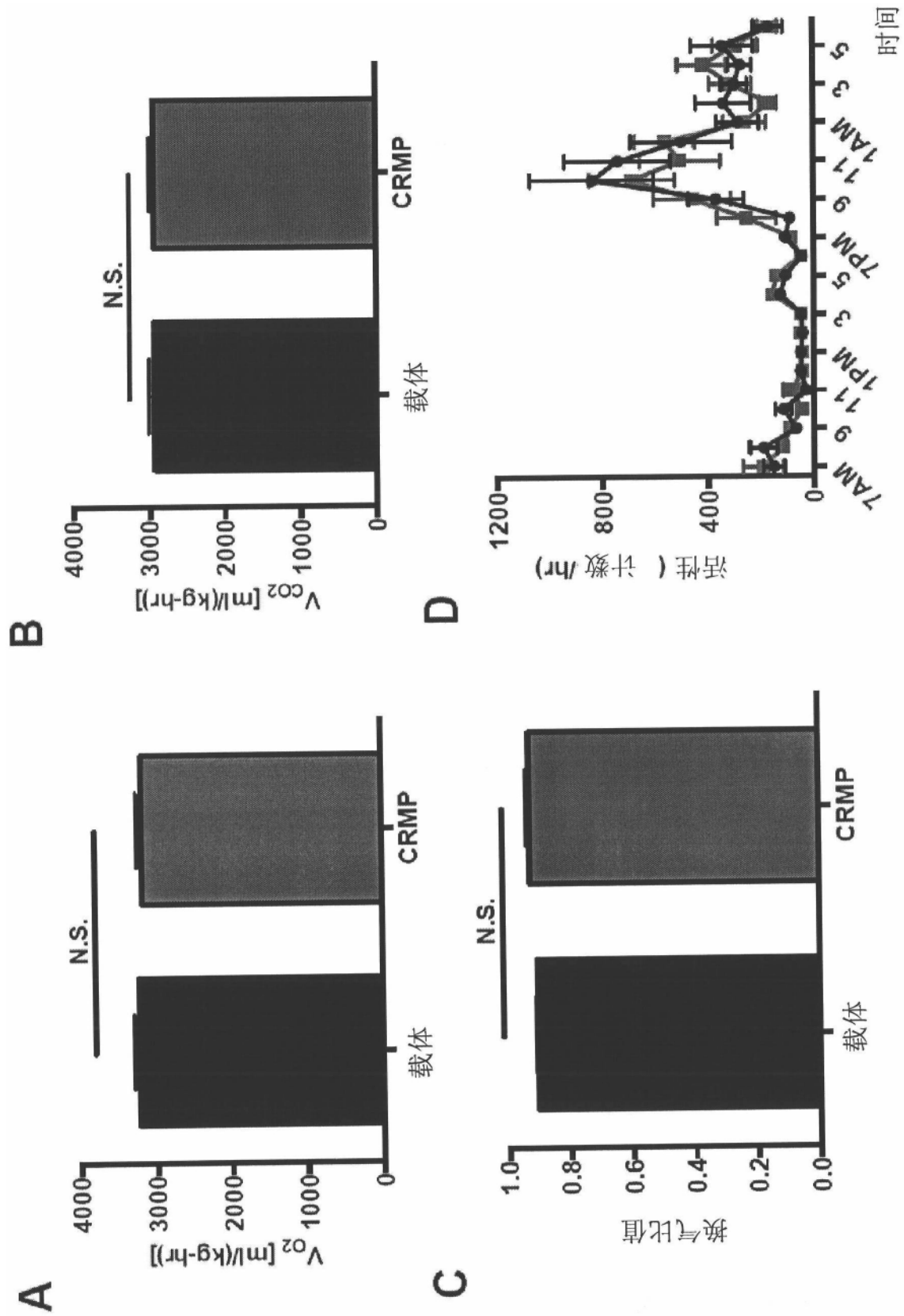


图23A-23D

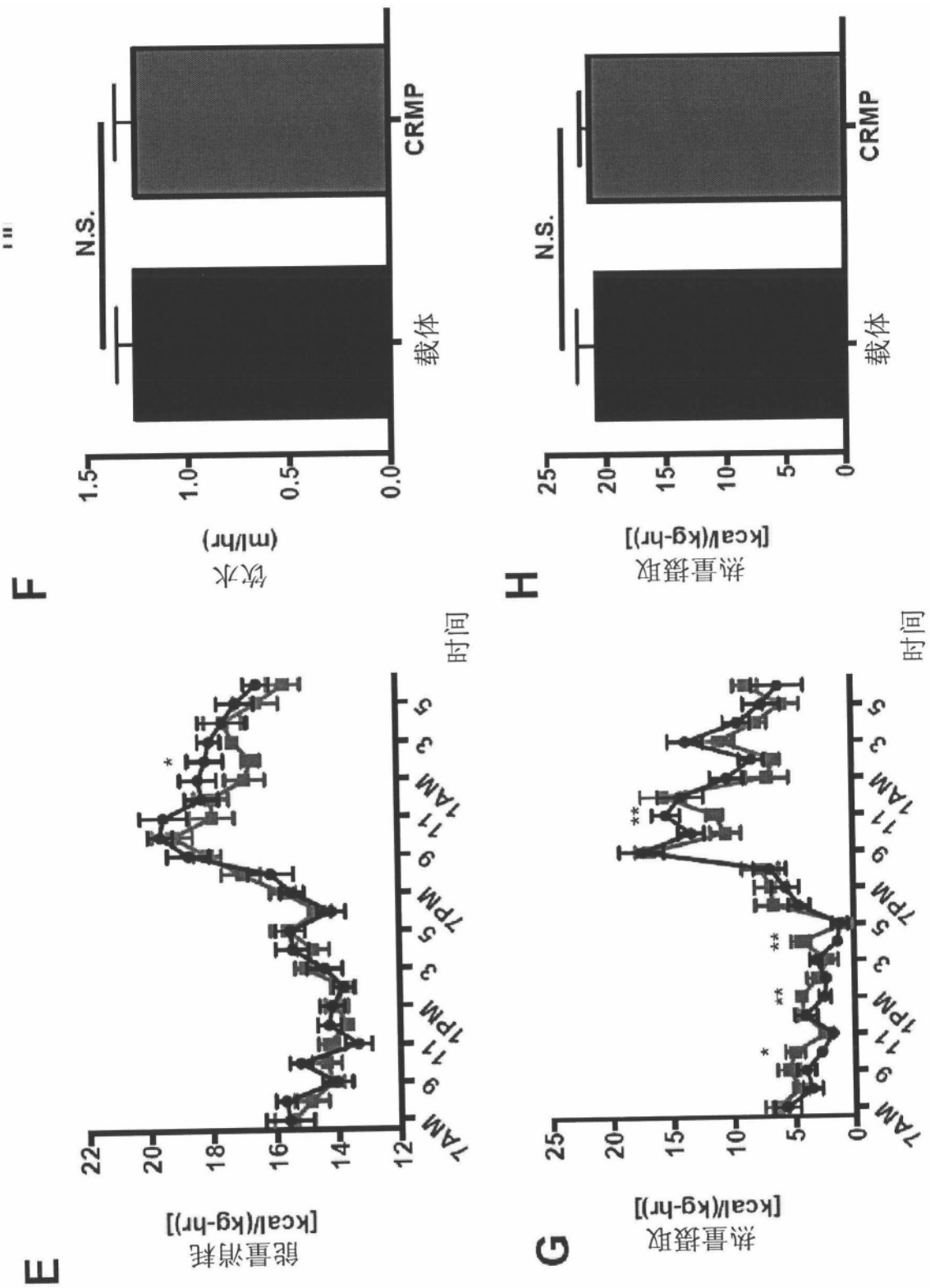


图23E-23H

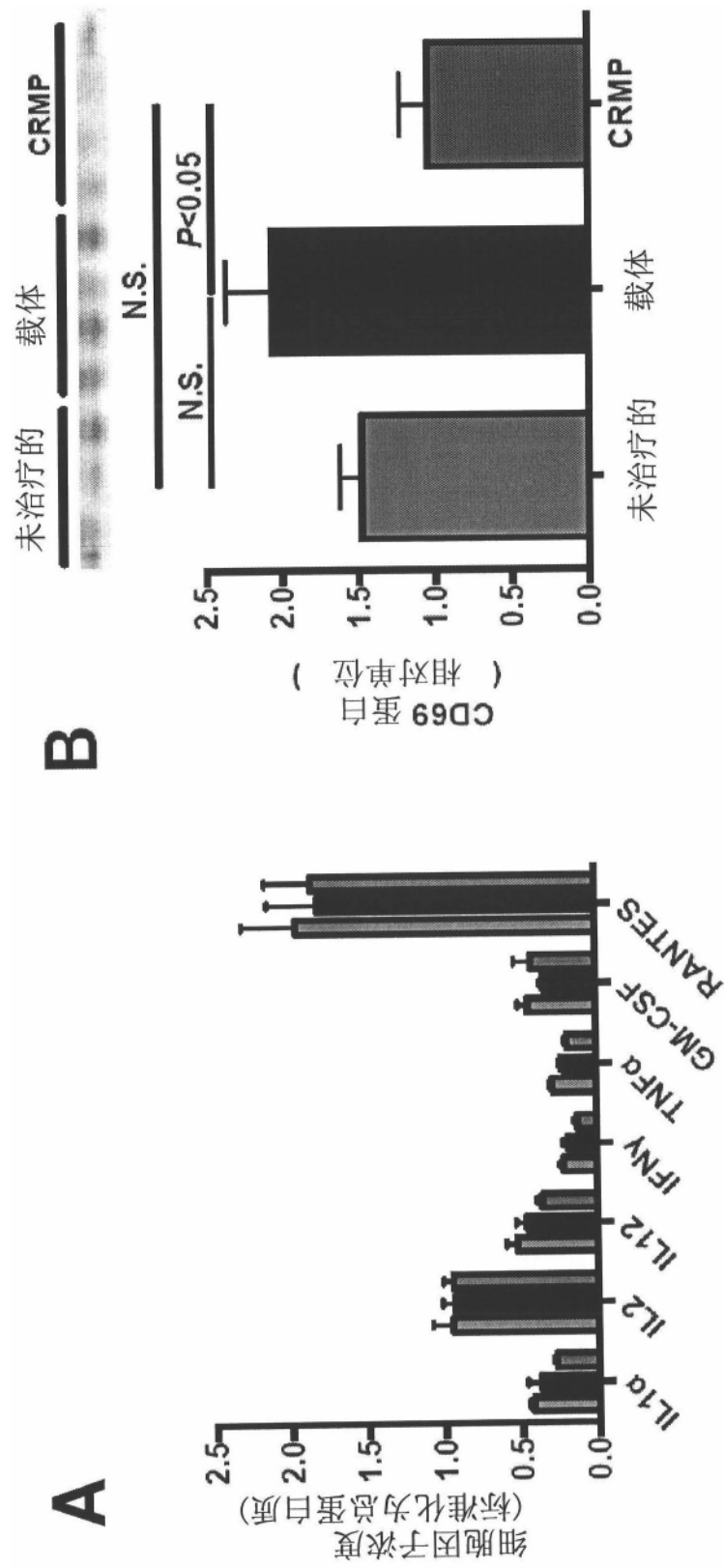


图24A-24B

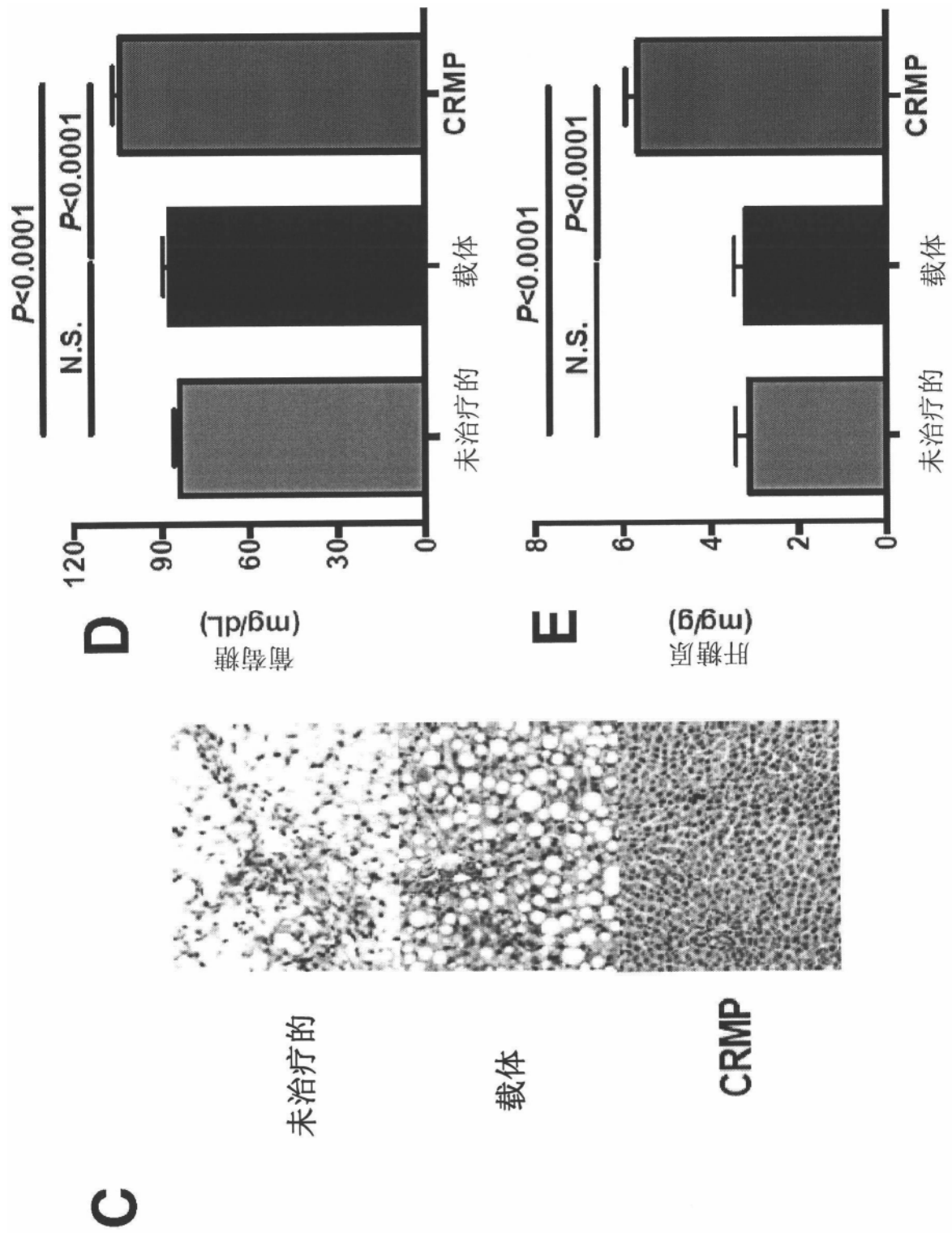


图24C-24E