

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 9 月 7 日 (07.09.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/116585 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/496 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2012/070808

(22) 国际申请日:

2012 年 1 月 31 日 (31.01.2012)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

201110049579.7 2011 年 3 月 2 日 (02.03.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 华中科技大学

同济医学院附属同济医院 (TONGJI HOSPITAL
TONGJI MEDICAL COLLEGE HUAZHONG UN-
IVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
[CN/CN]; 中国湖北省武汉市解放大道 1095 号,
Hubei 430030 (CN)。 杭州中美华东制药有限公司
(HANGZHOU ZHONGMEI HUADONG PHARMA-
CEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市
莫干山路 866 号, Zhejiang 310011 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 周平 (ZHOU, Ping)

[CN/CN]; 中国湖北省武汉市解放大道 1095 号,
Hubei 430030 (CN)。 姜凤超 (JIANG, Fengchao)
[CN/CN]; 中国湖北省武汉市解放大道 1095 号,
Hubei 430030 (CN)。

(74) 代理人: 武汉开元知识产权代理有限公司

(WUHAN KAIYUAN INTELLECTUAL PROPERTY
AGENT LTD.); 中国湖北省武汉市江岸区香港路
145 号远洋大厦 14 层, Hubei 430015 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保

护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保

护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: PHARMACEUTICAL USE OF AMINOTHIAZOLE MYD88 SPECIFICITY INHIBITOR

(54) 发明名称: 氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂的制药用途

(57) Abstract: Provided in the present invention is a pharmaceutical use of aminothiazole MyD88 specificity inhibitor, for use in preparing an immunosuppressant medicament, an anti-inflammatory medicament, a protection agent for post-ischemia reperfusion injury, and a preventative medicament for endotoxemia and sepsis.

(57) 摘要:

本发明提供了氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂的制药用途, 用于制备免疫抑制剂类药物、抗炎药物、缺血再灌注损伤保护剂以及内毒素血症和脓毒血症防治药物。



WO 2012/116585 A1

氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂的制药用途

技术领域

本发明涉及一类氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂作为免疫调节剂医药和科研领域的应用，尤其是在抗移植排斥、抗自身免疫疾病、抗缺血再灌注损伤和抗慢性炎症反应、抗内毒素血症等方面的用途。

背景技术

在本发明提出之前，本领域的医学专家十分清楚，对机体免疫系统的抑制性调控是治疗多种疾病的关键，如治疗器官移植后排斥反应、自身免疫性疾病、慢性炎症性疾病、缺血再灌注损伤等。而对免疫系统的调控可以从多方面入手的，而天然免疫反应作为近期研究的热点，是一个极佳的达成免疫抑制的方向。

机体免疫反应分为天然免疫和获得性免疫。其中，后者因为其特异性极强的识别功能和高效的反应效果一直以来被当作移植免疫的主要研究对象和干预靶。传统免疫反应被认为是由获得性免疫系统的第一和第二刺激信号激活 NF- κ B，激活的 NF- κ B 进入细胞核，启动转录，细胞合成和分泌各种炎性细胞因子，引发随后的一系列免疫反应。目前的抗排斥药物都是作用在获得性免疫系统上的。天然免疫一直被认为是机体的天然保护屏障，主要是抗击病毒细菌感染、外来生物入侵等，但最近几年大量的研究发现天然免疫系统在移植免疫、自身免疫性疾病和缺血损伤等方面发挥着极其重要的作用。天然免疫系统中又以 Toll 样受体 (Toll-Like Receptor, TLR) 发挥最主要的作用而最受关注，目前发现 TLR 有至少 14 个亚型，主要分布在 APC 等免疫细胞上，这些亚型除了 TLR3 以外，都要通过髓样分化蛋白(myeloid -differentiation protein 88, MyD88)分子传递信号。大量的研究显示各种内源性和外源性的危险因子，刺激天然免疫系统的各个 TLR，刺激信号经关键分子 MyD88 传导，最后也激活 NF- κ B，其后的免疫反应过程与前述的一样。

因此，简而言之，MyD88 就是天然免疫的关键分子节点，阻断了 MyD88 就阻断了天然免疫系统的主要反应，进而产生相应的免疫抑制效果。如果能够用一种治疗药物对其进行干预和阻断，就能够阻断 TLR 途径的主要信号从而达成一系列的免疫调控，可以预见这是达成免疫治疗的一条极佳的方案。

目前全世界成千上万的研究报告验证了此分子的重要性及阻断其后能达成的治疗效果，但都没有找到一种能对其进行抑制的药物。而其它的对 MyD88 分子的干涉途径如基因敲除等方法不能临床应用。

本发明设计人在 TLR/MyD88 方面所作的一系列前期研究，验证了 TLR 在移植免疫中起着重要作用，并通过对 MyD88 基因敲除小鼠的研究证实阻断 MyD88 分子能够诱导和维持移植免疫耐受，而在后期的相关研究中，本发明设计人通过与药学专业团队合作，制造合成并反复筛选获得了一类 MyD88 特异性抑制剂：一类氨基噻唑类小分子化合物（代号 TJ-M2010），此类小分子化合物由于结构上的活化位点与 MyD88 分子的关键活化位点相匹配而能特异性结合，故能够竞争性结合而抑制 MyD88 相应的信号传导。因此，将 MyD88 特异性抑制剂 TJ-M2010 应用于抗移植排斥、抗自身免疫疾病、抗缺血再灌注损伤和抗慢性炎症反应、抗内毒素血症等，开创了此类小分子物质的应用先河，为多种天然免疫相关性疾病找到了一种全新的药物治疗可能。

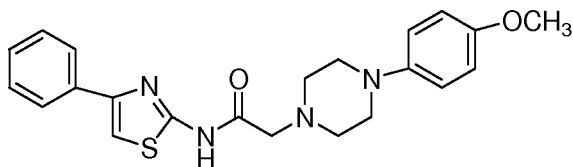
发明内容

本发明的目的在于提供一类氨基噻唑类小分子化合物作为 MyD88 特异性抑制剂，并应用其对天然免疫中 MyD88 分子的抑制作用，治疗多种免疫相关性疾病。实现本发明的具体技术方案的基础在于，本发明首先提出将此类氨基噻唑类 MyD88 分子类似物作为抗移植排斥、抗自身免疫疾病、抗缺血再灌注损伤和抗慢性炎症反应、抗内毒素血症等应用，是利用其对天然免疫中 MyD88 分子的抑制作用。

本发明所述的 MyD88 蛋白由两个结构域组成：包括 TIR（toll/IL-1 receptor domain）域和 DD 域（death domain），TIR 域是 MyD88 发生自身同源二聚化的物质基础，进而活化下游的 IRAK1 或 IRAK4 等激酶。经过对 MYD88 的 TIR 域的拓扑结构学分析后，合成一类 MyD88 特异性抑制剂 TJ-M2010。它们能特异性的结合在 MyD88 的 TIR 域，干扰 MyD88 的 TIR 域的功能，阻止 MyD88 形成同源二聚体，使 MyD88 不能活化，从而阻断 MyD88 通路转导，进而不能激活 NF- κ B，阻断了炎症反应，因而在相关的炎症及免疫疾病治疗方面有重要作用。

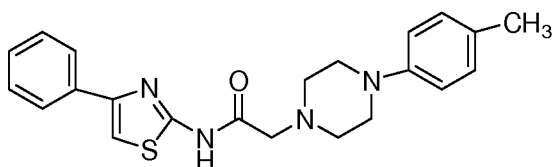
本发明所述的应用氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂的分子结构如下：

TJ-M2010-1



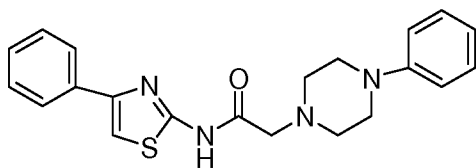
2-(4-(4-甲氧苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)乙酰胺

TJ-M2010-2



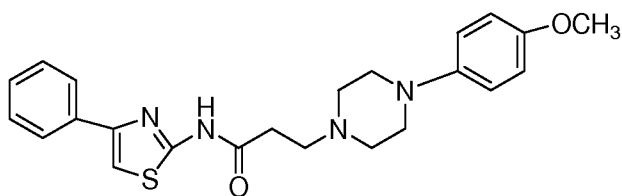
2-(4-(p-甲苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)乙酰胺

TJ-M2010-3



2-(4-苯基哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)乙酰胺

TJ-M2010-4



3-(4-(4-甲氧苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)丙酰胺

本发明 MyD88 特异性抑制剂 TJ-M2010 分子极小，结构稳定，可穿透细胞膜，并可同时在体内外应用。

本发明一类氨基噻唑类 MyD88 的特异性抑制剂 TJ-M2010，作为 NF- κ B 抑制剂，在制备免疫调节类药物上的应用。

本发明一类氨基噻唑类 MyD88 的特异性抑制剂 TJ-M2010，作为免疫调节剂，在治疗减低移植后排斥反应以及移植免疫耐受诱导和维持方面的应用。

本发明一类氨基噻唑类 MyD88 的特异性抑制剂 TJ-M2010，作为免疫调节剂，在治疗多种慢性炎症性疾病上的应用。例如慢性炎症性肠病、哮喘等。

本发明一类氨基噻唑类的特异性抑制剂 TJ-M2010，作为免疫调节剂，在治疗多种自身免疫性疾病上的应用。例如 I 型糖尿病、多发性硬化症、红斑狼疮等。

本发明一类氨基噻唑类 MyD88 的特异性抑制剂 TJ-M2010，作为免疫调节剂，在治疗缺血再灌注损伤类疾病上的应用。例如预防和治疗心梗后缺血再灌注损伤、断肢再植后缺血再灌注损伤、移植物术后的缺血再灌注损伤以及器官保存液、细胞保存液的制作等。

本发明一类氨基噻唑类 MyD88 的特异性抑制剂 TJ-M2010，作为免疫调节剂，在治疗脓毒血症和内毒素血症方面的应用。

本发明的优越性在于，将一类新型自主合成的化合物 TJ-M2010 作为 MyD88 特异性抑制剂应用在实验中，充分证实了该在用于移植后抗排斥和诱导免疫耐受、治疗各种炎症反应、防治缺血再灌注损伤等方面具有明显的效果。将是一种有效的免疫抑制剂、或移植耐受诱导剂、或移植耐受维持剂、抗炎药物和免疫调节剂。该类新型化合物能够有效抑制 CD80、CD86 表达，从而阻止 DC 细胞的成熟。DC 细胞成熟已被证明为多种自身免疫性疾病如自身免疫性心肌病、实验自身免疫性葡萄炎、I 型糖尿病、多发性硬化症、红斑狼疮等发病的关键步骤之一。故该类 MyD88 抑制剂 TJ-M2010 可用于此类疾病的治疗。MyD88 途径阻断可以明显起到对缺血再灌注损伤的保护作用，故此类 MyD88 抑制剂 TJ-M2010 可用于防止如心梗后缺血再灌注损伤、断肢再植后缺血再灌注损伤、移植物术后的缺血再灌注损伤、器官保存液、细胞保存液等许多方面起到重要作用。体外实验结果表明这类 MyD88 抑制剂 TJ-M2010 通过抑制该通路能有效减少移植物内炎症因子水平，说明其与炎症因子的产生密切相关，故可能成为各类炎症治疗的有效手段。

附图说明

图 1 心脏移植物生存曲线

图 2 皮肤移植物生存曲线图

图 3 TJ-M2010 剂量相关地减少 T 细胞活化图

TJ-M2010 抑制 LPS、CpG 引起的共刺激分子 CD80 的上调图

图 4 TJ-M2010 减低糖尿病发生率曲线图

图 5 TJ-M2010 影响移植受体体内淋巴细胞亚群柱状图

图 6 TJ-M2010 改善小鼠肾脏 IRI 生存率生存曲线图

图 7 TJ-M2010 保护小鼠肾脏 IRI 肾功能（血肌酐、尿素氮）图

图 8 TJ-M2010 减弱 CpG 刺激 DC 活化引发的 T 细胞增殖流式图

图 9 TJ-M2010 减少移植物内炎症因子实时定量 PCR 分析图（IL-1 β ，TNF- α ，IL-6 三种炎症因子相对水平）

图 10 TJ-M2010 减少肺炎模型中炎症细胞渗出图

图 11 TJ-M2010 减少肺炎模型中炎症因子渗出图

图 12 内毒素和脓毒血症致死实验生存曲线

附图 1 中 Balb/c 和 C57bl/6 为两种小鼠品系

分组: Balb/c 心脏移植给 C57bl/6 为普通对照组，CMC 溶媒对照组，C57bl/6 到 C57bl/6 为同系对照图，TJ-M2010 实验组

附图 2 中异基因皮肤移植对照组（文献报导排斥时间为 8-10 天）、单用 TJ-M2010 组、单用 MR1 组和联合用药组（TJ-M2010+MR1）

附图 3（a）中，TJ-M2010 剂量相关地减少 T 细胞活化；附图 3（b）中，LPS、CPG、心肌组织匀浆溶媒刺激 DC，TJ-M2010 下调 CD80 的表达。附图 3（c）为 TJ-M2010 剂量相关性下调 DC 表面 CD 80 表达，附图 3（d）为 TJ-M2010 剂量相关性下调巨噬细胞表面 CD80 表达。

附图 4 中实验分组：MyD88KO NOD 小鼠，MyD88KO/+NOD 小鼠，NOD 小鼠 TJ-M2010 用药组。

在附图 5 中，图 5 为不同移植组别受体脾脏内淋巴细胞亚群分析（同基因组，治疗组，对照组），显示 TJ-M2010 治疗的移植受者体内 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞比例明显上调

附图 6 中 分组：MYD88 KO,TJ-M2010,CMC,Control 对照各组 8 只

I/R 对照组 I/R CMC 为溶媒对照组 I/R TJ-M2010 为实验组

附图 10 中 a、b 分别为支气管肺泡中细胞总数，中性粒细胞数

附图 11 中 a 为肺组织中髓过氧化酶活性, b 为肺组织中白细胞介素-6 浓度

附图 12 中 a 为内毒素血症致死实验生存曲线, b 为脓毒血症致死实验生存曲线图。

具体实施方式

应用实例 1: TJ-M2010 用于移植后抗排斥反应和诱导移植免疫耐受。

1) TJ-M2010 用于小鼠心脏移植模型

实验共分为四组, 分别为:

空白对照组 (不做任何处理, 做心脏移植)、CMC 组 (溶媒对照组)、同系心脏移植组 (理论上同系无排斥, 长期存活) 和 TJ-M2010 用药组 (效果检测组)。具体处理方法如下:

空白对照组: 取 Balb/c 小鼠心脏移植到 C57bl/6 小鼠腹腔, 术后不做特殊处理;

CMC 对照组: 取 Balb/c 小鼠心脏移植到 C57bl/6 小鼠腹腔, 术后心脏移植前第 0 天到第 6 天给予腹腔注射不含 TJ-M2010 的羧甲基纤维素钠 (0.5%CMC) 溶液, 200 μ l。

同系心脏移植组: 取 C57bl/6 小鼠心脏移植到同系 C57bl/6 小鼠腹腔, 术后不做特殊处理;

TJ-M2010 用药组: 取 Balb/c 小鼠心脏移植到 C57bl/6 小鼠腹腔, 术后心脏移植前第 0 天到第 6 天给予腹腔注射溶于 CMC 的 TJ-M2010, 150mg/kg。

所得实验结果如生存曲线图 (见附图 1) 所示, 结果显示空白对照组和文献报道排斥时间基本一致, 为 8 天左右; CMC 溶媒对照组无差异; 同系心脏移植组心脏长期存活, TJ-M2010 用药组平均心脏移植存活时间 20 天左右, 较对照组有明显延长。

2) TJ-M2010 联合共刺激分子抑制剂-抗 CD154 单抗 (MR1) 用于小鼠皮肤移植模型

实验分为 5 组: 异基因皮肤移植对照组 (文献报导排斥时间为 8-10 天)、单用 TJ-M2010 组、单用 MR1 组和联合用药组 (TJ-M2010+MR1)。

具体处理方式如下:

异基因皮肤移植 CMC 对照组: 取 Balb/c 小鼠皮肤移植到 C57bl/6 小鼠背部, 术后第 0-3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 天腹腔注射 0.5%CMC200 μ l/天; 同基因皮肤移植组: 取 C57bl/6 小鼠皮肤移植到 C57bl/6 小鼠背部, 术后不做特殊处理。

单用 TJ-M2010 组: 取 Balb/c 小鼠皮肤移植到 C57bl/6 小鼠背部, 术后第 0-3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 天分别腹腔注射溶于 0.5%CMC 的 TJ-M2010, 150mg/kg/d;

单用 MR1 组：取 Balb/c 小鼠皮肤移植到 C57bl/6 小鼠背部，术后第 0，1，3，7，14 天给予腹腔注射 MR1，200 μ g /天；

联合用药组：取 Balb/c 小鼠皮肤移植到 C57bl/6 小鼠背部，术后术后第 0-3，5，7，9，11，13，15 天分别腹腔注射溶于 0.5%CMC 的 TJ-M2010，150mg/kg/d，同时第 0-3，5，7，9，11，13，15 天给予腹腔注射 MR1，200 μ g/天。

所得到实验结果如生存曲线图（见附图 2）所示，异基因皮肤移植对照组移植物排斥时间为 10 天左右，和文献报导时间一致

单用 TJ-M2010 组和单用 MR1 组皮肤移植物排斥时间 10 天左右，无统计学差异，而联合用药组（TJ-M2010+MR1）皮肤移植物长期存活达 150 天（文献认为>100 天为移植物耐受）

可见 TJ-M2010 和 MR1 单用对耐受诱导无明显效果，但联合应用效果显著，能使及其难以诱导耐受的皮肤移植物长期存活。

以上实验结果直接和间接说明，MyD88 抑制剂在用于移植后抗排斥和诱导免疫耐受具有明显的效果。将是一种特殊的免疫抑制剂、或移植耐受诱导剂（短期用药即可使极难移植成功的皮肤移植物长期存活）、或移植耐受维持剂（如可对抗细菌感染所诱发的排斥）。其独特的作用是目前的免疫抑制剂不可比拟和替代的。

应用实例 2：MyD88 抑制剂用于治疗自身免疫性疾病。

体外实验——细胞流式仪结果：证明 MyD88 抑制剂可阻止 DC 成熟，用于治疗自身免疫性疾病。

步骤：1.应用了 TJ-M2010 的 BALB/c 小鼠来源骨髓细胞，破红， 2×10^6 /ML 密度 RPMI1640 培养基（加 GM-CSF10ng/ml，IL-4 10ng/ml）

2.48 小时去悬浮细胞，第六天收悬浮及半贴壁细胞

3.DCs 加 50mM TJ-M2010 培养 1 小时，加入坏死心肌上清液，LPS(200ng/ml)，Poly I:C (20 mg/ml)，CpG (10 mg/ml)培养 12 小时

4.加流式抗体 FITC 标记抗 CD80,CD86，上机检测

TJ-M2010 抑制了 RAW264.7 细胞对 TLR 刺激物（LPS、CpG）引起的共刺激分子 CD80 的上调，说明 TJ-M2010 能够有效的阻断 TLR 信号通路，进而抑制了细胞的免疫反应。

附图 3 (c)、(d) 实验过程如下:

Raw264.7: 48 孔板 细胞数为 9×10^5 /孔, 每孔 1ml 培养基体系, 首先加入不同浓度梯度 TJ-M2010 预孵育 2h, 然后加入 CPG, 终浓度 40ug/ml, 37°C CO₂ 培养箱孵育过夜 (12h)。加流式抗体 FITC 标记抗 CD80, CD86, 上机检测;

DC: 48 孔板, 细胞数为 1×10^6 /孔, 每孔 1ml 培养基体系, 首先加入不同浓度梯度 TJ-M2010 预孵育 2h, 然后加入 LPS, 终浓度 1ug/ml, 37°C CO₂ 培养箱孵育过夜 (12h)。加流式抗体 FITC 标记抗 CD80, CD86, 上机检测以上二图中可见 TJ-M2010 对 DC 和巨噬细胞表面 CD80 表达起一浓度相关性抑制。

附图 3: TJ-M2010 抑制 LPS、CpG 引起的共刺激分子 CD80/CD86 的上调

以上检测结果说明 MyD88 抑制剂可降低 CD80 表达, 从而阻止 DC 细胞的成熟。DC 细胞成熟已被证明为多种自身免疫性疾病如自身免疫性心肌病、实验自身免疫性葡萄炎、I 型糖尿病、多发性硬化症、红斑狼疮等发病的关键步骤之一。故 MyD88 抑制剂可用于此类疾病的治疗。

体内试验: 应用 MyD88^{-/-}以及 TJ-M2010 对构建 I 型糖尿病模型的影响

实验步骤:

1. 实验分组: MyD88KO NOD 小鼠, MyD88KO/+NOD 小鼠, NOD 小鼠 TJ-M2010 用药组

2. 用药组: 抗原注射前 1 天, 第 0-3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 天分别腹腔注射溶于 0.5%CMC 的 TJ-M2010, 150mg/kg/d

3. 各组均腹腔注射分支杆菌抗原并持续监测其浓度

4. 清洁级饲养观察 30 周, 取尾静脉血, 测非空腹血糖, 连续 2 次所测血糖 ≥ 22 mmol/L 为糖尿病建模标准

所得 I 型糖尿病发生率曲线见附图 4:

结果显示: MyD88KO 杂合子组随着时间延长 I 型糖尿病发生逐渐增加, 而 MyD88KO 纯合子组无 I 型糖尿病发生, TJ-M2010 组 I 型糖尿病发生率与 MyD88KO 纯合子组相当, 说明 MyD88 通路与 I 型糖尿病的发生有必然的联系, 阻断其通路能减少糖尿病的发生, 因此小分子 MyD88 抑制剂 TJ-M2010 可能成为 I 型糖尿病的有效防治方法。

应用实例 3: MyD88 抑制剂用于预防和治疗缺血再灌注损伤。

体外实验：对接受抗原（同基因，异基因）刺激的受体脾脏内淋巴细胞亚群分析及同时接受过 TJ-M2010 治疗的受者体内 CD4+CD25+Foxp3+T 细胞比例流式检测

实验步骤：

- 1、取不同组别（同基因，异基因抗原刺激）受体脾脏，碾磨分离淋巴细胞
- 2、加流式抗体 APC 标记的 IFN- γ 和 APC 标记的 IL-17，APC 标记的 CD25 和 PE 标记的 Foxp3
- 3、上流式细胞仪分析不同移植组别受体脾脏内淋巴细胞亚群和 TJ-M2010 治疗的移植受者体内 CD4+CD25+Foxp3+T 细胞比例

见附图 5,结果显示 TJ-M2010 治疗的移植受者体内 CD4+CD25+Foxp3+T 细胞比例明显上调，而 IFN- γ 和 IL-17 明显低于 CMC 对照组。

通过应用 MyD88 抑制剂 TJ-M2010 后，对移植受体脾脏内淋巴细胞亚群分析和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞比例的检测发现 TJ-M2010 的应用通过上调 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞而改变受体小鼠的移植耐受状态。而大量文献表明调节性 T 细胞可以通过其免疫抑制作用调节炎症的发展，炎症因子，促炎症因子的释放与缺血再灌注时细胞因子的交联，从而出现损伤，因此，TJ-M2010 的应用通过抑制 TLR 信号，抑制 NF- κ B 活化，减少炎症因子（IFN- γ 和 IL-17）的表达，从而减轻损伤。

体内实验部分：

MyD88 途径阻断减轻肾脏缺血再灌注损伤实验：

实验步骤：

1.分组：普通 C57bl/6 组（Control），CMC 溶媒组，MYD88KO 组，TJ-M2010 组各组 8 只做缺血再灌注处理：麻醉，血管夹阻断左侧肾脏，置温箱 31°，80min 后开放并切除右侧肾脏，关腹。24 小时取血用于 BUN，Cr 检测。

2.TJ-M2010 组和 CMC 组，术前 1 天和手术当天分别腹腔注射溶于 0.5%CMC 的 TJ-M2010，150mg/kg/d；CMC 组：0.5%CMC 溶液，200 μ l。

3.观察小鼠生存时间，做生存曲线。血标本送病理科做 BUN,Cr 检测。

4.结果显示 TJ-M2010 显著提高小鼠肾脏 IRI 后生存率，而且对肾功能有很好的保护效果。

结果见附图 6 和附图 7。

由以上实验可见 MyD88 途径阻断可以明显起到对缺血再灌注损伤的保护作用，故 MyD88 抑制剂可用于防止如心梗后缺血再灌注损伤、断肢再植后缺血再灌注损伤、移植术后的缺血再灌注损伤、器官保存液、细胞保存液等许多方面起到重要作用。

应用实例 4：MyD88 抑制剂用于治疗慢性炎症性疾病。

体外实验：TJ-M2010 减弱 CpG 刺激 DC 活化引发的 T 细胞增殖及移植物内炎症因子实时定量 PCR 分析

实验步骤：

1、取 Bal b/c 小鼠股骨，分离骨髓细胞，加入 GMS-CSF 和 IL-4 细胞因子，培养骨髓源性 DC

2、培养至第六天，吹打细胞，分离未成熟 DC。离心，1640 培养基重悬。

3、加入丝裂霉素（使终浓度达 50 μ g/ml），37 $^{\circ}$ C 水浴，15min。1640 洗一次，计数。

4、取 C57bl/6 小鼠脾脏，利用小鼠淋巴细胞分离液分离脾脏淋巴细胞，并计数。

5、取 C57bl/6 小鼠脾脏淋巴细胞标记 CFSE。

6、Bal b/c 来源的 DC 与 C57bl/6 小鼠淋巴细胞做混合淋巴细胞培养。并分组如下：

空白组：在混合培养的过程中不加 CPG 及 TJ-M2010。

对照组：在混合培养的过程中加 CPG 而不加 TJ-M2010。

实验组 1：在混合培养的过程中同时加 CPG 及 TJ-M2010，其中 TJ-M2010 的量为 10 μ M。

实验组 2：在混合培养的过程中同时加 CPG 及 TJ-M2010，其中 TJ-M2010 的量为 20 μ M。

实验组 3：在混合培养的过程中同时加 CPG 及 TJ-M2010，其中 TJ-M2010 的量为 40 μ M。

1、培养至第三天，收集细胞，流式检测 C57bl/6 小鼠淋巴细胞增殖情况。

流式结果见附图 7

结果显示：随着 TJ-M2010 量的增加，T 细胞增殖（CD44 为其表面标志）呈下降趋势

说明 TJ-M2010 可减弱 CpG 刺激 DC 活化引发的 T 细胞增殖

实时定量 PCR 步骤： 1. 从接受抗原（同基因，异基因）刺激的受体用 TRIzol 法

抽提总 RNA

2. 逆转录为 cDNA, 两步法 RT-PCR

3. 做标准曲线对比得出 IL-1 β , TNF- α , IL-6 相对水平

附图九为移植物内炎症因子 (IL-1 β , TNF- α , IL-6) 实时定量 PCR 分析

结果显示: 心脏移植物内炎症因子水平 TJ-M2010 组明显比对照组低, 有显著统计学差异

体外实验结果表明 MyD88 抑制剂 TJ-M2010 通过抑制该通路能有效减少移植物内炎症因子水平 (IL-1 β , IL-6 较 CMC 异基因移植组明显降低), 说明其与炎症因子的产生密切相关, 故可能成为各类炎症治疗的有效手段。

体内试验:

MyD88 途径阻断降低小鼠气管炎症反应

方法与步骤:

1. 动物分组: C57bl/6(B6)NaCl (200 μ l 滴鼻) 组, C57bl/6(B6)BLM 组和 TJ-M2010BLM 组 (第 0-3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 天分别腹腔注射溶于 0.5%CMC 的 TJ-M2010, 150mg/kg/d)。

2. BLM (博来霉素) 滴鼻制作肺炎模型: 40 μ l 氯胺酮甲苯噻嗪气道麻醉, 鼻腔滴入法 BLM 硫酸盐 (300 μ g or 15 mg/kg)

3. 支气管肺泡灌洗液 (BAL) 收集细胞及细胞因子: 切开气管, 插入塑料套管, 37 $^{\circ}$ C, 0.3ml PBS 灌洗, 抽吸灌洗液 (回抽达 95% 以上), 重复 10 次。灌洗液分两部分: 一部分用于细胞因子检测 (600g 离心 10min 收集上清存放 -80 $^{\circ}$ C 用于检测) 一部分用于细胞计数 (连同下层 0.4ml 重悬) 4 $^{\circ}$ C 计数

4. 肺匀浆检测组织内细胞及因子: BAL 后, 取整肺, 搅碎, 离心取上清 -80 $^{\circ}$ C 存放用于 MPO 的检测

5. 肺 MPO 活性检测: 盐水经右心充分灌洗肺脏, 肺匀浆, 离心去上清, 1ml PBS (含 0.5% HTAB, 5mM EDTA) 重悬沉淀。离心, 50 μ l 上清加入试管 (200 μ l PBS-HTAB-EDTA, 2ml HBSS, 100 μ l 二盐酸邻联茴香胺 (1.25 mg/ml), 100 μ l H₂O₂ 0.05%), 15min, 37 $^{\circ}$ C 漩涡水箱, 100 μ l NaN₃ 1% 中止反应, 460nm 检测 MPO 吸光度值。

6. 细胞计数: MG-1L 染色 4min, 95%GS-500 染色 8min, 涂片计数

7. 因子检测: IL-6 水平用 ELISA 检测

8.统计学分析：U 检验分析统计学差异

附图 9：显示 MYD88-/-小鼠在支气管炎发生过程中募集中性粒和淋巴细胞减少

实验分组：B6NaCL 组，B6BLM 组和 TJ-M2010BLM 组 (n=4)

在 TJ-M2010 组支气管肺泡中性粒细胞募集明显减少。

a 图显示第 1, 7, 11 天的细胞总数，WT 小鼠和 TJ-M2010BLM 组有统计学差异；

b 图显示 WT 小鼠支气管肺泡中性细胞 24h 达峰,持续 7 天,11 天恢复,而 TJ-M2010 组明显募集减少

附图 11 图显示 TJ-M2010BLM 组减轻 BLM 诱导的肺炎症反应，表现为炎症细胞及炎症因子的减少。

a 图肺组织中 MPO 因子（第 7 天检测）的减少

b 图分别显示 24h 肺组织中 IL-6 的减少

从炎症细胞的募集到炎症因子的释放两个方面的实验可以看出 TJ-M2010BLM 组明显减轻 BLM 引起的肺炎症反应，从而证明 TJ-M2010 的抗炎效果。

以上实验说明 MyD88 途径阻断可降低炎症反应。因此 MyD88 抑制剂可用于治疗多种慢性炎症性疾病，如慢性炎症性肠病、哮喘等。

应用实例 5：MyD88 抑制剂用于治疗内毒素血症以及脓毒血症

第一部分:观察 MyD88 抑制剂对内毒素血症小鼠死亡率的影响。小鼠随机分为 2 组：溶剂对照组 (Vehicle) 和实验组 (TJ-M2010 防治组)，各 20 只。其中 TJ-M2010 防治组给予 TJ-M2010 (0.5%CMC 溶剂, 25mg/ml) 灌胃，剂量为 250mg/kg (200μL 每只)；溶剂对照组给予 0.5%CMC 灌胃，200μL 每只。每天一次，连续灌胃三天。第三天灌胃后 1 小时后予 LPS 腹腔注射，每十二小时观察存活情况，观察三天。观察得到的生存曲线情况如图 12 (a)

如图所示，所用的两种 MyD88 抑制剂能有效延迟内毒素致死事件，降低内毒素的致死率。

第二部分：观察 MyD88 抑制剂对脓毒症小鼠死亡率的影响。小鼠随机分成:假手术组、模型组、MyD88 抑制剂治疗组。除假手术组只做开腹后缝合以外,对脓毒症模型组和 MyD88 抑制剂治疗组小鼠施行盲肠结扎穿孔术(CLP),复制脓毒症小鼠模型。术后 1h, 分别予以 0.5%CMC200μL 或 TJ-M2010 灌胃 250mg/kg (200μL) ,1 次/12h,连续 4 次。术

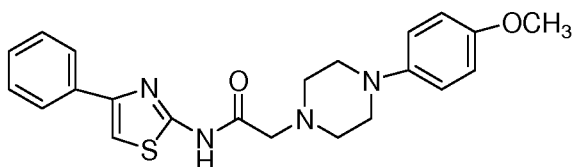
后每 12h 观察各组小鼠生存率一次,连续观察 72h。所得观察生存率情况如图 12(b)。

如图可见, MyD88 抑制剂 TJ-M2010 对小鼠脓毒症死亡时间和最终死亡率有比较明显改善作用。

权 利 要 求 书

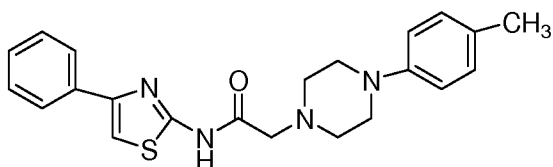
1.一类氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂，作为免疫调节剂，具有以下分子结构式：

TJ-M2010-1



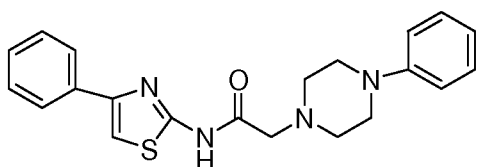
2-(4-(4-甲氧苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)乙酰胺

TJ-M2010-2



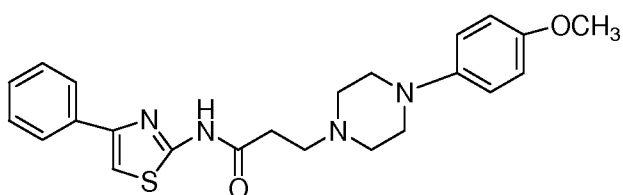
2-(4-(p-甲苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)乙酰胺

TJ-M2010-3



2-(4-苯基哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)乙酰胺

TJ-M2010-4



3-(4-(4-甲氧苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-苯基噻唑-2-基)丙酰胺

其特征在于：一类氨基噻唑类 MyD88 特异性抑制剂，可用于制备免疫抑制剂类药物，

在治疗减低移植后排斥反应以及移植免疫耐受诱导和维持方面的应用，或用于作为抗炎药物，在治疗多种慢性炎症性疾病上的应用，或用于制备自身免疫治疗药物，在治疗多种自身免疫性疾病上的应用，或用于制备缺血再灌注损伤保护剂，在治疗缺血再灌注损伤类疾病上的应用，或用于制备内毒素血症和脓毒血症防治药物，用于内毒素血症和脓毒血症防治上的应用。

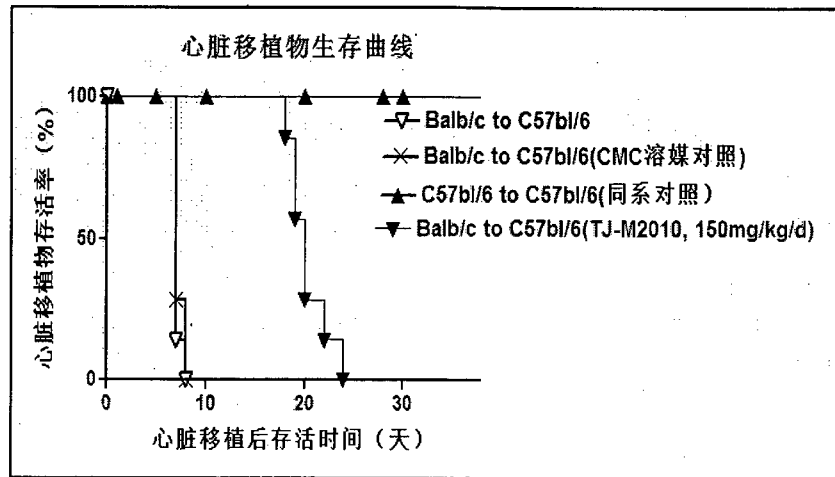


图 1

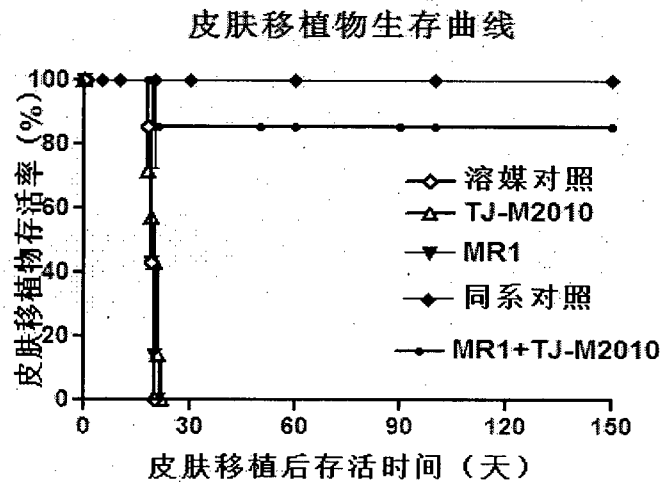


图 2

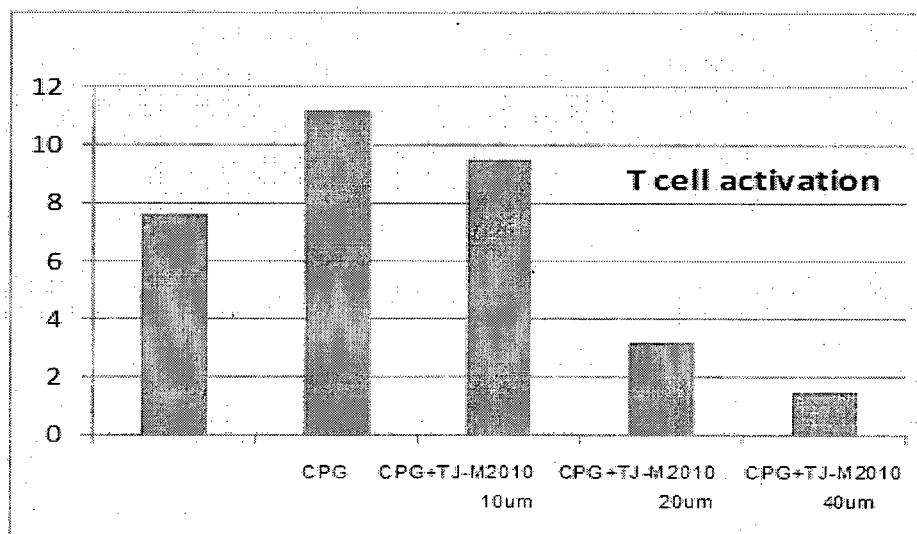


图 3a

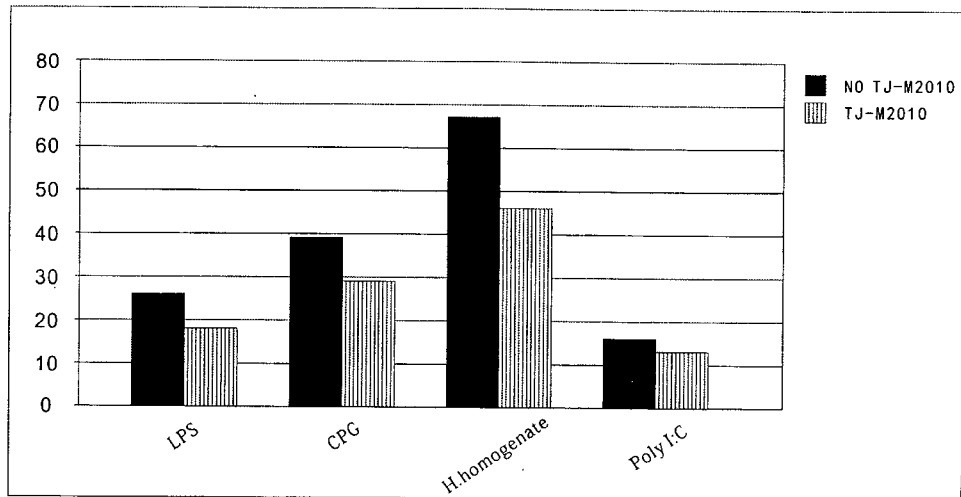


图 3b

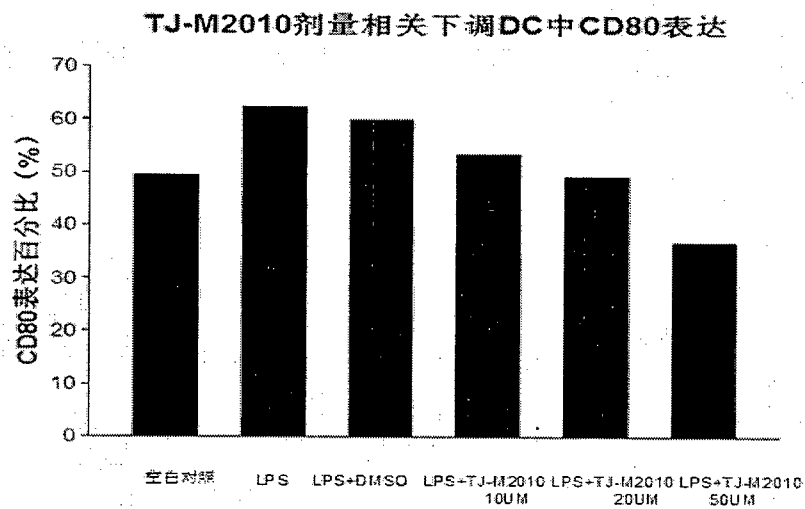


图 3c

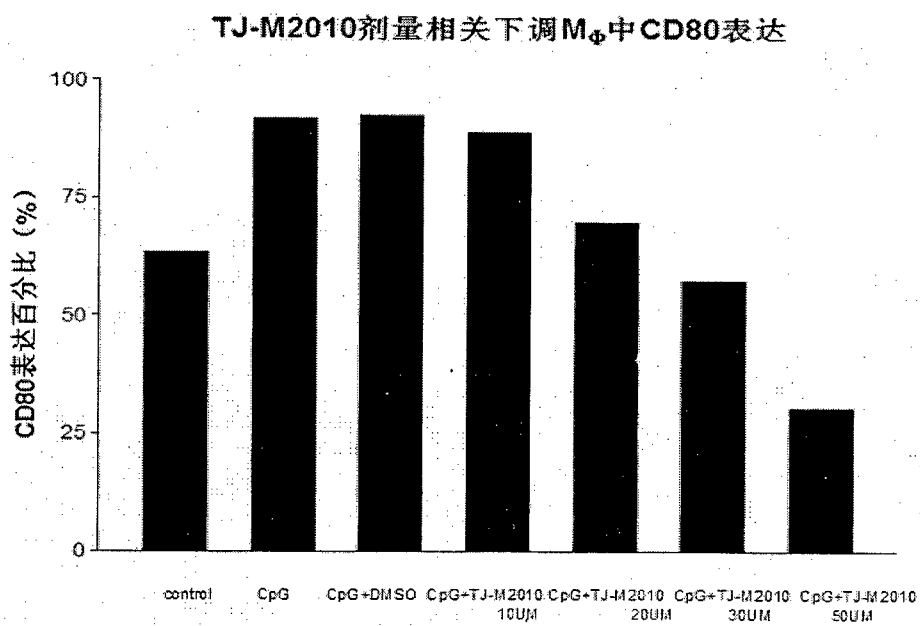


图 3d

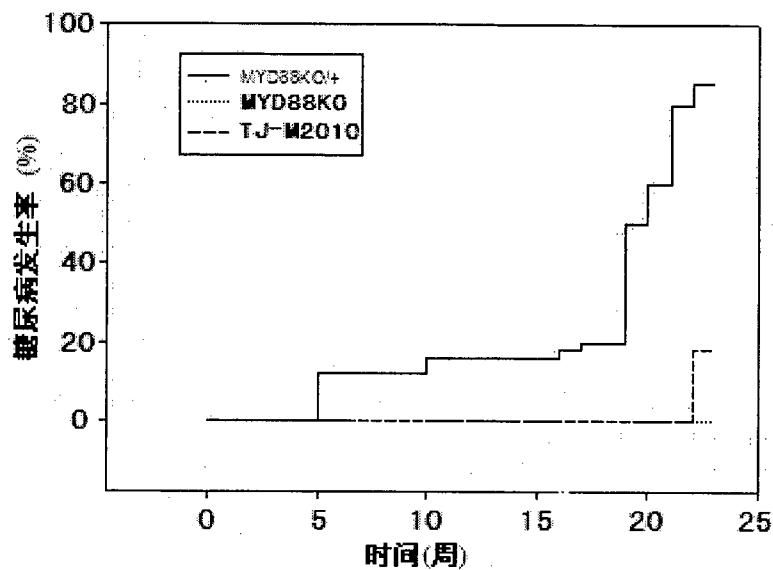


图 4

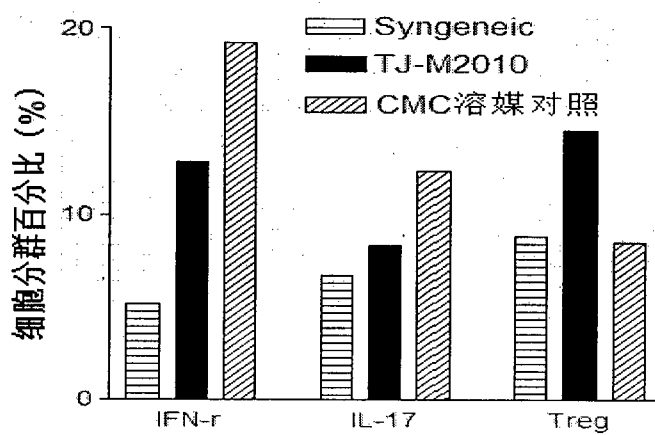


图 5

肾IRI生存曲线

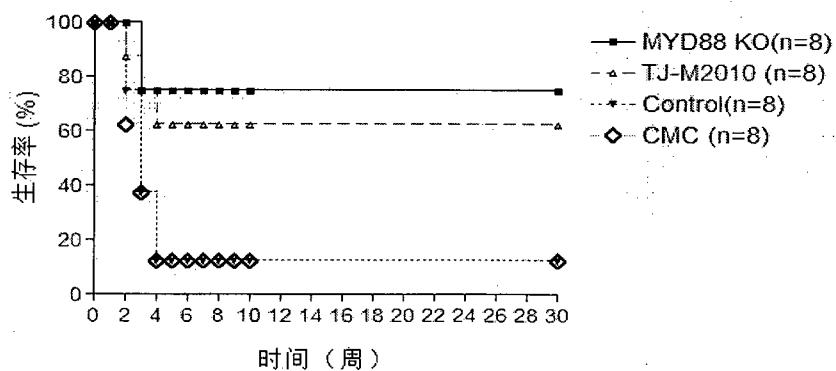


图 6

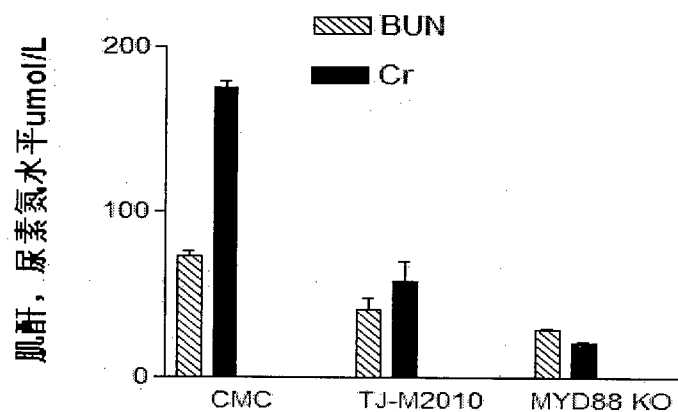


图 7

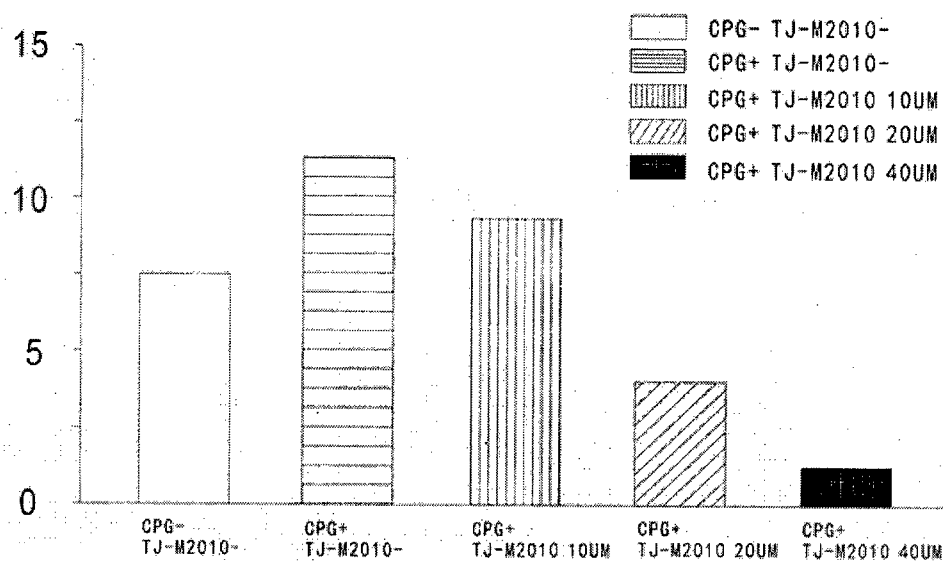


图 8

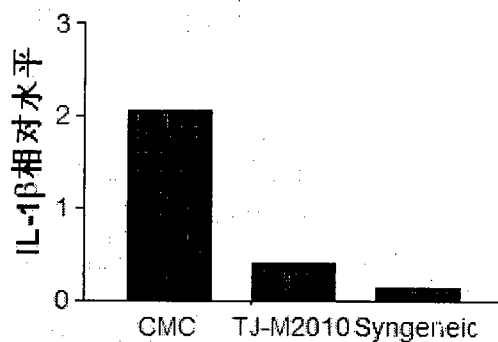


图 9a

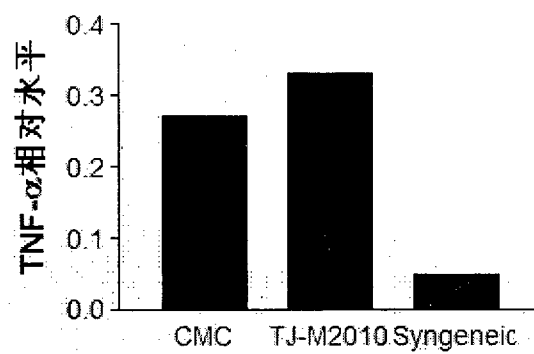


图 9b

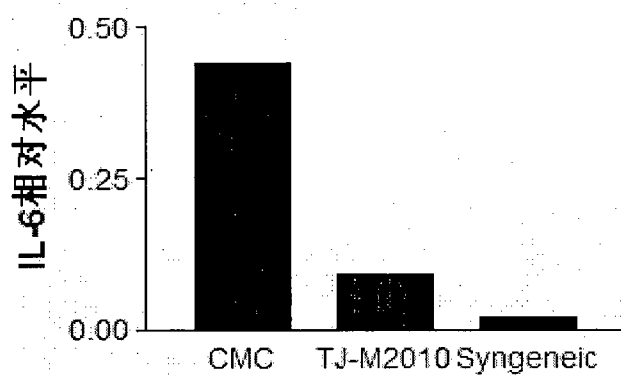


图 9c

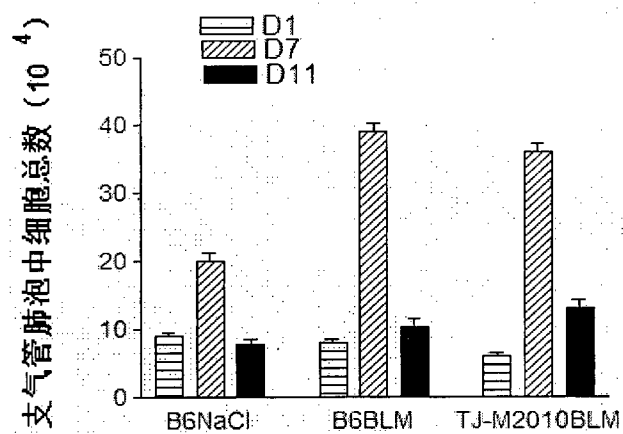


图 10a

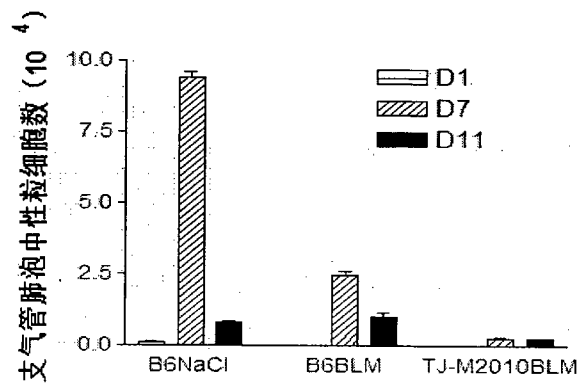


图 10b

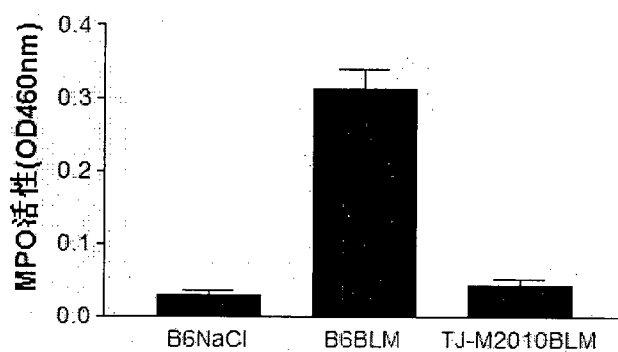


图 11a

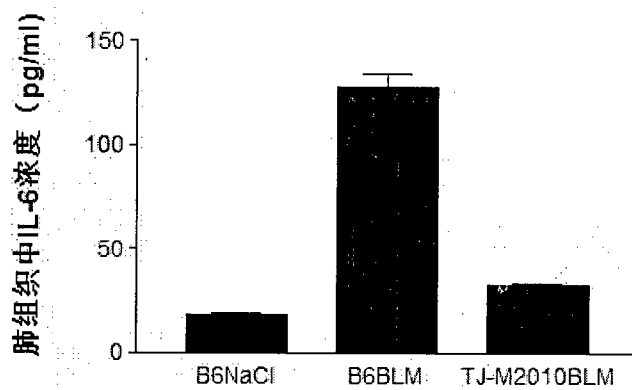


图 11b

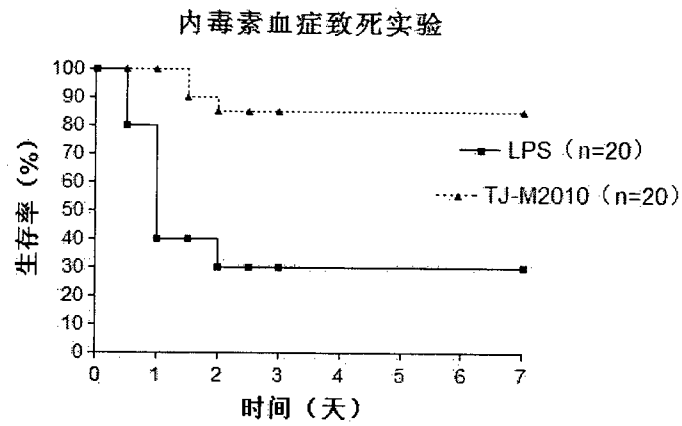


图 12a

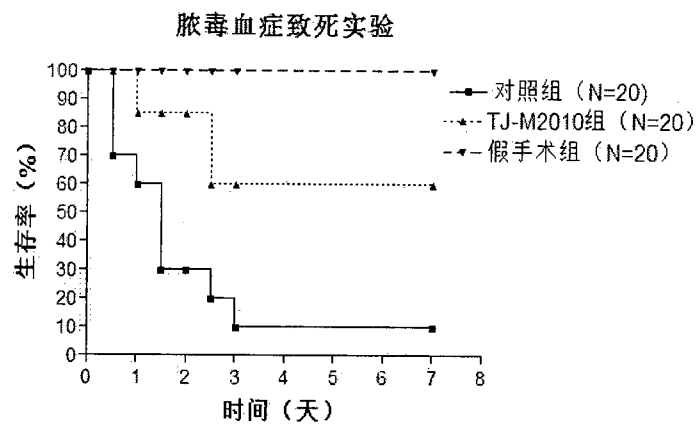


图 12b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/070808

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT(CN), CNKI(CN), CHINESE PHARMACEUTICAL ABSTRACTS (CN), CHEMICAL ABSTRACTS (US), EMBASE, STN: Aminothiazole, myd88 inhibitor, piperazidine; piperazine, thiazole, Phthalylsulfathiazole, acetamide; ethanamide, immunodepressant, antiinflammatory, ischemia reperfusion, endotoxin, structure search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAPADOPOULOU, C. et al. Synthesis and biological evaluation of new thiazolyl/benzothiazolyl-amides, derivatives of 4-phenyl-piperazine. II Farmaco. 60 (2005), pages 969-973, table 1a.	1
PX	CN 102166214 A (TONGJI HOSPITAL OF TONGJI MEDICAL COLLEGE OF HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY), 31 August 2011 (31.08.2011), claim 1	1
E	CN 102336720 A (HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 01 February 2012 (01.02.2012), description, paragraphs 88, 106, 107, 110, 111, 115, and 116	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 19 April 2012 (19.04.2012)	Date of mailing of the international search report 10 May 2012 (10.05.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XIU, Wen Telephone No.: (86-10) 62411205

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/070808

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102166214 A	31.08.2011	None	
CN 102336720 A	01.02.2012	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/070808

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

A61K 31/496 (2006.01) i

A61P 37/06 (2006.01) i

A61P 29/00 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i

A61P 7/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/070808

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI,EPODOC,CNPAT(CN), CNKI(CN), 中国药学文摘库(CN), CHEMICAL ABSTRACTS(US),EMBASE,STN:
氨基噻唑, Aminothiazole, myd88 抑制剂, 哌嗪, piperazine;piperazine, 噻唑, Phthalylsulfathiazole, 乙酰胺, acetamide;ethanamide, 免疫抑制剂, immunodepressant, 抗炎, antiinflammatory, 缺血再灌注, 内毒素, endotoxin, 结构式检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	C. Papadopoulou 等. Synthesis and biological evaluation of new thiazolyl/benzothiazolyl-amides, derivatives of 4-phenyl-piperazine. II Farmaco. 60(2005). 第 969-973 页 表 1a.	1
PX	CN 102166214 A (华中科技大学同济医学院附属同济医院) 31.8 月 2011(31.08.2011) 权利要求 1	1
E	CN 102336720 A(华中科技大学) 01.2 月 2012(01.02.2012) 说明书第 88、106、107、110、111、115、116 段	1

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
19.4 月 2012(19.04.2012)

国际检索报告邮寄日期
10.5 月 2012 (10.05.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

修文
电话号码: (86-10) **62411205**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/070808

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102166214 A	31.08.2011	无	
CN 102336720 A	01.02.2012	无	

主题的分类:

A61K31/496 (2006.01) i

A61P37/06 (2006.01) i

A61P29/00 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i

A61P 7/00 (2006.01) i