(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119855586 A
(43)申请公布日 2025.04.18

(21)申请号 202380062675.6
(22)申请日 2023.07.27
(30)优先权数据
63/393,585 2022.07.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/028833 2023.07.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/026012 EN 2024.02.01
(71)申请人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国
(72)发明人 A·M·那尔 朱赤 J·Y-S·李
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 邹智弘
(51)Int.Cl.
*A61K 31/335*(2006.01)
*A61K 31/34*(2006.01)
*A61K 31/341*(2006.01)

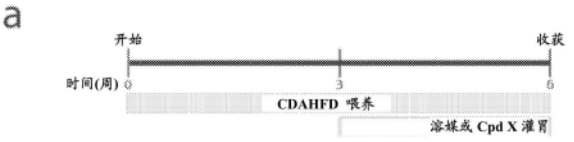
权利要求书2页 说明书29页 附图47页

(54)发明名称

# 用于治疗代谢障碍的组合物和方法

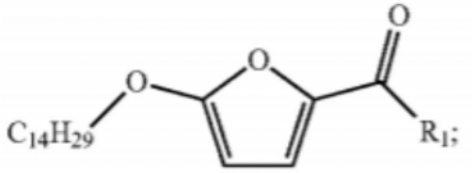
(57)摘要

本公开内容提供了用于治疗代谢障碍的方法。该方法总体上涉及向对其有需要的个体施用有效量的式I化合物。




CN 119855586 A

1.在个体中治疗代谢障碍的方法,所述方法包括对所述个体施用有效量的式I化合物:




**(式I),**

其中:$R^1$为—O—$R^2$、—O—$R^3$—O$R^2$、—O—$R^3$—OC(O)—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^4$)C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)N($R^5$)$R^6$或—N($R^5$)$S(O)_2$—$R^4$;

每个$R^2$独立地为烷基、卤代烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^3$独立地为任选地被取代的亚烷基链;$R^4$为任选地被取代的烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^5$独立地为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基;每个$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^4$;或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选地被取代的N-杂芳基;所述式I化合物为单个的立体异构体或为其混合物或其药学上可接受的盐的形式。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述化合物为5-(十四烷氧基)-2-糠酸。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述代谢障碍为胰岛素抵抗、高血糖症、2型糖尿病、肥胖症、脂肪性肝病、葡萄糖不耐受、高胰岛素血症、代谢综合征或高血压。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述代谢障碍包括胰岛素抵抗。

5.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述代谢障碍包括代谢综合征。

6.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述代谢障碍包括2型糖尿病。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述个体具有>30.0的身体质量指数。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述施用导致血清胰岛素水平在正常范围内。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述施用导致血糖水平在正常范围内。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法,另外包括施用至少一种另外的治疗性药剂。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述至少一种另外的治疗性药剂为胰岛素、胰岛素类似物、双胍类或噻唑烷二酮类。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述施用为经口施用。

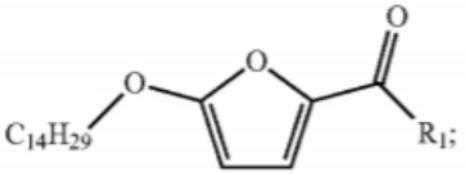
13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述式I化合物为每日施用。

14.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述式I化合物为每周施用一次。

15.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述式I化合物为通过受控递送施用。

16.根据权利要求15所述的方法,其中所述式I化合物存在于可植入递送装置中。

17.在个体中治疗代谢综合征的方法,所述方法包括对所述个体施用有效量的式I化合物:




**(式 I),**

其中:$R^1$为—O—$R^2$、—O—$R^3$—O$R^2$、—O—$R^3$—OC(O)—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^4$)C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)N($R^5$)$R^6$或—N($R^5$)$S(O)_2$—$R^4$;

每个$R^2$独立地为烷基、卤代烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^3$独立地为任选地被取代的亚烷基链;$R^4$为任选地被取代的烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^5$独立地为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基;每个$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^4$;或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选地被取代的N-杂芳基;所述式I化合物为单个的立体异构体或为其混合物或其药学上可接受的盐的形式。

18.根据权利要求17所述的方法,其中所述化合物为5-(十四烷氧基)-2-糠酸。

19.根据权利要求17或权利要求18所述的方法,其中所述施用为经口施用。

20.根据权利要求17-19中任一项所述的方法,其中所述式I化合物为每日施用。

21.根据权利要求17-19中任一项所述的方法,其中所述式I化合物为每周施用一次。

22.根据权利要求17-19中任一项所述的方法,其中所述式I化合物为通过受控递送施用。

23.根据权利要求22所述的方法,其中所述式I化合物存在于可植入递送装置中。

# 用于治疗代谢障碍的组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2022年7月29日提交的美国临时专利申请第63/393,585号的权益,该申请通过引用以其整体并入本文。

## 背景技术

[0003] 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)已成为全球肝病的主要来源。临床上,NAFLD描述了一系列肝事件,从中度脂质积聚至更具侵袭性的脂肪变性,伴有炎症、气球样肝细胞、纤维化、肝硬化,和在某些情况下,肝细胞癌(HCC)。脂质的过度积聚是疾病从临床上无症状的NAFLD进展至炎症、纤维化和肝硬化非酒精性脂肪性肝炎(NASH)阶段的主要风险因素。

[0004] 代谢障碍如胰岛素抵抗、高血糖症、2型糖尿病、肥胖症、脂肪性肝病、葡萄糖不耐受、高胰岛素血症、代谢综合征和高血压是主要的健康问题。

[0005] 本领域存在对治疗代谢障碍的方法的需要。

## 发明内容

[0006] 本公开内容提供了用于治疗代谢障碍的方法。该方法总体上涉及向对其有需要的个体施用有效量的式I化合物。

## 附图说明

[0007] 图1A-1C阐明了TOFA治疗在患有CDAHFD诱导的NAFLD进展的小鼠中的剂量依赖效应。

[0008] 图2A-2I阐明了TOFA治疗对60％kcal脂肪饮食诱导的代谢综合征和早期NAFLD进展的作用。

[0009] 图3A-3F显示了TOFA治疗在CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH进展小鼠中的挽救作用。

[0010] 图4A-4E显示了来自用TOFA治疗的CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH小鼠的肝脏样品的RNA测序结果。

[0011] 图5A-5G阐明了TOFA治疗在自由进食饲料小鼠中的安全性和耐受性特性。

[0012] 图6A-6H阐明了TOFA治疗在患有用60％HFD饮食模型饮食诱导肥胖症的小鼠中的剂量依赖效应。

[0013] 图7A-7D显示了来自TOFA治疗在60％HFD饮食诱导的肥胖症小鼠模型的肝脏中的基因变化的转录分析。

[0014] 图8A-8I显示了在CDAHFD饮食诱导的NAFLD/NASH小鼠模型中TOFA治疗效力的深入分析。

[0015] 图9A-9I显示了与溶媒对照、Firsocostat、非诺贝特(Fenofibrate)、和Firsocostat与非诺贝特的组合治疗相比,TOFA的基准效力比较。

[0016] 图10A-10I显示了TOFA和司美格鲁肽(Semaglutide)作为单一药剂治疗剂和组合

的治疗效力研究。

[0017] 图11A-11P分别显示了在遗传性PPARA敲除模型中TOFA对于CDAHFD和60％kcal脂肪(HFD)饮食二者分别诱导的NAFLD/NASH和DIO的模型的作用。

[0018] 定义

[0019] 术语“糖尿病”和“糖尿病的”是指涉及胰岛素的产生或利用不足的糖代谢的进行性疾病,其特征常在于高血糖症和糖尿。术语“糖尿病前期”和“糖尿病前期的”是指一种状态,其中受试者不具有糖尿病中典型地观察到的特征、症状等,但确实具有如果不治疗,可以发展成糖尿病的特征、症状等。可以使用例如空腹血浆葡萄糖(FPG)测试或口服葡萄糖耐量试验(OGTT)确定这些病症的存在。两者都通常要求受试者在开始测试前禁食至少8个小时。在FPG测试中,在禁食结束后测量受试者的血糖;通常,受试者禁食过夜,并且在受试者进食前的早晨测量血糖。健康受试者通常将具有介于约90与约100mg/dl之间的FPG浓度,患有“糖尿病前期”的受试者通常将具有介于约100与约125mg/dl之间的FPG浓度,并且患有“糖尿病”的受试者通常将具有高于约126mg/dl的FPG水平。在OGTT中,在禁食后测量受试者的血糖,并且在饮用富含葡萄糖的饮料后两小时再次测量。饮用富含葡萄糖的饮料两小时后,健康受试者通常具有约140mg/dl以下的血糖浓度,糖尿病前期受试者通常具有约140至约199mg/dl的血糖浓度,并且糖尿病患者通常具有200mg/dl以上的血糖浓度。虽然前述提及的血糖值适用于人类受试者,但在鼠类受试者中,血糖量正常、中度高血糖症和显性高血糖症定标不同。禁食4小时后的健康鼠类受试者通常将具有介于约100与约150mg/dl之间的FPG浓度,患有“糖尿病前期”的鼠类受试者通常将具有介于约175与约250mg/dl之间的FPG浓度,患有“糖尿病”的小鼠受试者通常将具有高于约250mg/dl的FPG浓度。

[0020] 本文所使用的术语“胰岛素抵抗”是指正常量的胰岛素无法产生正常生理或分子反应的病症。在某些情况下,超生理量的胰岛素,无论是内源性产生的或是外源性施用的,能够全部或部分克服胰岛素抵抗,并且产生生物反应。

[0021] 术语“代谢综合征”是指相关联的特征簇,其包括但不限于高胰岛素血症、葡萄糖耐量异常、肥胖症、脂肪向腹部或上半身隔室的再分布、高血压、纤维蛋白溶解异常和血脂异常,其特征在于高甘油三酯、低高密度脂蛋白(HDL)-胆固醇和高小密度低密度脂蛋白(LDL)颗粒。患有代谢综合征的受试者有罹患2型糖尿病和/或其他障碍(例如动脉粥样硬化)的风险。

[0022] 术语“葡萄糖代谢障碍”包括这样的任何障碍,其特征在于相对于健康个体,受试者中与葡萄糖水平升高和/或胰岛素水平升高相关的临床症状或临床症状的组合。葡萄糖和/或胰岛素水平升高可以尤其表现在以下疾病、障碍和病症中:高血糖症、2型糖尿病、妊娠糖尿病、1型糖尿病、胰岛素抵抗、葡萄糖耐量减低、高胰岛素血症、糖代谢受损、糖尿病前期、其他代谢障碍(如代谢综合征,其也被称为X综合征)和肥胖症。本公开内容的多肽及其组合物可以用于,例如,实现和/或维持葡萄糖稳态,例如,降低血流中的葡萄糖水平和/或降低胰岛素水平至在健康受试者中发现的范围。

[0023] 本文所使用的术语“高血糖症”是指相对于健康个体,葡萄糖循环量在受试者的血浆中升高的病症。高血糖症可以使用本领域已知的方法诊断,包括如本文所描述的空腹血糖水平的测量。

[0024] 本文所使用的术语“高胰岛素血症”是指在血糖水平升高或正常的同时,循环胰岛

素的水平升高的病症。高胰岛素血症可以由与血脂异常相关的胰岛素抵抗引起,如高甘油三酯、高胆固醇、高的低密度脂蛋白(LDL)和低的高密度脂蛋白(HDL);高尿酸水平;多囊卵巢综合征;2型糖尿病和肥胖症。当血浆胰岛素水平高于约2μU/mL,可以诊断为高胰岛素血症。

[0025] 本文所使用的短语“体重障碍”是指与体重过重和/或食欲增强相关的病症。将各种参数用于确定受试者与参比健康个体相比是否超重,包括受试者的年龄、身高、性别和健康状况。例如,通过评估受试者的身体质量指数(BMI),其通过将按千克计的受试者的体重除以按平方米计的受试者的身高计算,受试者可以被视为超重或肥胖。具有在约18.5kg/$m^2$至约24.9kg/$m^2$范围内的BMI的成人被视为具有正常的体重;具有介于约25kg/$m^2$与约29.9kg/$m^2$之间的BMI的成人可以被视为超重(肥胖前期);具有约30kg/$m^2$以上的BMI的成人可以被视为肥胖。食欲增强常常导致体重过重。存在若干与食欲增强相关的病症,包括例如夜食症,其特征在于早晨厌食和晚上多食,经常与失眠相关,但其可涉及下丘脑损伤。

[0026] 本文所使用的术语“治疗(treatment/treating)”等是指获得期望的药理学和/或生理学作用。该作用在完全或部分预防疾病或其症状方面可以是预防性的,和/或在部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的不良反应方面可以是治疗性的。本文所使用的“治疗”涵盖哺乳动物中,例如人类中疾病的任何治疗,并且包括:(a)预防在可以是易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中疾病的发生;(b)抑制疾病,即阻止它的发展;和(c)缓解疾病,即引起疾病的消退。

[0027] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”,在本文中可互换使用,是指个体生物,例如哺乳动物,包括但不限于鼠类、类人猿、人类、非人灵长类、有蹄类、猫科动物、犬科动物、牛、羊、哺乳动物类家养动物、哺乳动物类运动动物和哺乳动物类宠物。在一些情况下,“个体”为人类。

[0028] 在另外描述本发明之前,应当理解,本发明并不限于所描述的具体实施方案,因此当然可以改变。还应当理解,本文所使用的命名法仅出于描述具体实施方案的目的,并非旨在限制,因为本发明的范围将仅被所附权利要求限制。

[0029] 在提供了值的范围的情况下,应理解的是,除非上下文另有明确规定,否则介于该范围的上限和下限与所述范围内的任何其他规定或中间值之间的每个中间值,至下限单位的十分之一,都包括在本发明中。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小的范围内,并且也包括在本发明中,但受制于所述范围内的任何明确排除的限制。当所述的范围包括一个或两个限值时,排除那些所包括的限值中的任一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0030] 除非另有定义,否则本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些相似或等效的任何方法和材料也可用于本发明的实践或测试,但优选的方法和材料是现在所描述的。本文提及的所有出版物均通过引用并入本文,以公开和描述与被引用的出版物有关的方法和/或材料。

[0031] 必须注意,除非上下文明确另有说明,否则本文和所附的权利要求中所使用的单数形式“一个/一种(a/an)”和“该(the)”包括复数指示物。因此,例如,提及“式I化合物”包括多个这样的化合物,和提及“代谢障碍”包括提及本领域技术人员已知的一个或多个代谢障碍及其等同物等。另外注意,可以起草权利要求以排除任何任选的要素。因此,该陈述旨

在充当用于与权利要求要素的记载相关的这样的排他性术语如“唯一”、“仅”等的使用或“否定的”限制的使用的在先基础。

[0032] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则术语“一个/一种(a/an)”、“该(the)”和类似的指示物在描述本公开内容的上下文中(特别是在下述权利要求的上下文中)要被解释为涵盖单数和复数二者。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式术语(即意指“包括,但不限于”)。除非本文中另有说明,否则本文中对值的范围的记载仅旨在充当单独引用落在范围内每个单独值的简写方法,并且每个单独的值都被纳入本说明书中,如同它在本文单独记载那样。例如,如果范围10-15被公开,那么11、12、13和14也被公开。除非本文中另有说明或与上下文明显矛盾,本文所描述的所有方法都可以以任何合适的顺序执行。除非另有声明,使用本文中提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“如”)仅旨在更好地阐明本公开内容的实施方案,而不是对本公开内容的范围造成限制。说明书中没有任何语言应被解释为表明任何未要求保护的要素对本公开内容的实施方案的实践至关重要。

[0033] 本文所使用的与量有关使用的术语“约”表明该量可以改变所述量的10%。例如,“约100”意指90-110的量。将约用于范围的上下文中,“约”用于提及范围的较低量意指较低量包括比范围的较低量低10%的量,并且“约”用于提及范围的较高量意指较高量包括比范围的较高量高10%的量。例如,约100至约1000意指范围扩展为90至1100。

[0034] 本文所使用的术语“和/或”短语如“A和/或B”旨在包括A和B二者;A或B;A(单独);和B(单独)。同样,本文所使用的术语“和/或”短语如“A、B、和/或C”旨在包括以下实施方案的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0035] 应理解,本文所描述的本公开内容的方面和实施方案包括“包含方面和实施方案”、“由方面和实施方案组成”和“主要由方面和实施方案组成”。

[0036] 应意识到,本发明的某些特征,为清楚起见,其在单独的实施方案的上下文中描述,也可以在单个实施方案中组合提供。相反,本发明的各种特征,为简洁起见,其在单个实施方案的上下文中描述,也可以单独或以任何合适的子组合提供。与本发明有关的实施方案的所有组合都由本发明明确包括,并且在本文中公开,就如同每个和每一个组合都单独和明确地公开那样。此外,各种实施方案及其要素的所有子组合也被本发明明确包括,并且在本文中公开,就如同每个和每一个这样的子组合都单独和明确地在本文中公开那样。

[0037] 提供本文所讨论的出版物仅用于其在本申请的申请日之前公开。本文中任何内容均不应解释为承认本发明无权凭借在先发明先于这样的出版物。此外,所提供的出版日期可能与实际出版日期不同,这可能需要独立确认。

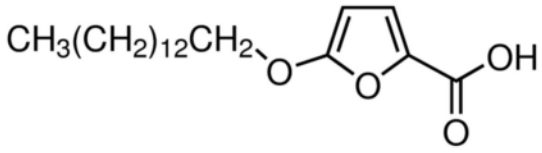
## 具体实施方式

[0038] 本公开内容提供用于治疗代谢障碍的方法。该方法总体上涉及向对其有需要的个体施用有效量的式I化合物。

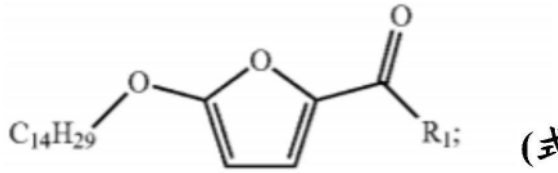
[0039] TOFA和TOFA类似物

[0040] 在一些情况下,本公开内容提供了在个体中治疗代谢障碍的方法,该方法包括向患者施用治疗有效量的5-(十四烷氧基)-2-糠酸(TOFA)或TOFA类似物或衍生物。TOFA具有

以下结构：

[0041] 

[0042] 在一些情况下，本公开内容提供了在个体中治疗代谢障碍的方法，该方法包括向患者施用治疗有效量的TOFA的类似物。例如，在一些情况下，本公开内容的方法包括施用式I化合物：

[0043]  (式 I)

[0044] 其中：$R^1$为—O—$R^2$、—O—$R^3$—O$R^2$、—O—$R^3$—OC(O)—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^4$)C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)N($R^5$)$R^6$或—N($R^5$)S(O)$_2$—$R^4$；

[0045] 每个$R^2$独立地为烷基、卤代烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基；每个$R^3$独立地为任选地被取代的亚烷基链；$R^4$为任选地被取代的烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基；每个$R^5$独立地为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基；每个$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^4$；或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选地被取代的N-杂芳基；所述式I化合物为单个的立体异构体或为其混合物或其药学上可接受的盐的形式。

[0046] 可以在本文所命名的某些化学基团前加上简写符号，表明在所表明的化学基团中应发现的碳原子的总数。例如，$C_7$-$C_{12}$烷基描述了如下定义的烷基基团，具有总计7至12个碳原子，和$C_4$-$C_{12}$环烷基烷基描述了如下定义的环烷基烷基基团，具有总计4至12个碳原子。简写符号中的碳的总数不包括可以存在于所描述的基团的取代基中的碳。

[0047] 除上述外，除非规定与之相反，否则以下术语具有所表明的意义："氨基"是指—$NH_2$残基。"氰基"是指—CN残基。"羟基"是指—OH残基。"亚氨基"是指=NH取代基。"硝基"是指—$NO_2$残基。"Oxo"是指=O取代基。"硫代"是指=S取代基。"三氟甲基"是指—$CF_3$残基。

[0048] "烷基"是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链烃链残基，不含有不饱和度，具有1至12个碳原子，优选1至8个碳原子或1至6个碳原子，和通过单键连接至分子的其余部分，例如甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基等。除非说明书中明确另有说明，否则烷基基团可以任选地被以下基团之一取代：烷基、烯基、卤代、卤代烯基、氰基、硝基、芳基、环烷基、杂环基、杂芳基、氧代、三甲基硅烷基、—O$R^{14}$、—OC(O)—$R^{14}$、—N($R^{14}$)$_2$、—C(O)$R^{14}$、—C(O)O$R^{14}$、—C(O)N($R^{14}$)$_2$、—N($R^{14}$)C(O)O$R^{16}$、—N($R^{14}$)C(O)$R^{16}$、—N($R^{14}$)S(O)$_t$$R^{16}$(其中t为1至2)、—S(O)$_t$O$R^{16}$(其中t为1至2)、—S(O)$_p$$R^{16}$(其中p为0至2)和—S(O)$_t$N($R^{14}$)$_2$(其中t为1至2)，其中每个$R^{14}$独立地为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基；并且每个$R^{16}$为烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、

杂芳基或杂芳基烷基。

[0049] “亚烷基链”或“亚烷基链”是指将分子的其余部分连接至残基基团的直链或支链二价烃链，仅由碳和氢组成，不含有不饱和度并且具有1至12个碳原子，例如亚甲基、亚乙基、亚丙基、正亚丁基等。亚烷基链通过单键连接至分子的其余部分，并且通过单键连接至残基基团。亚烷基链与分子其余部分和与残基基团的连接点可以通过链内的一个碳或任何两个碳。除非说明书中另有明确说明，否则亚烷基链可以任选地被以下基团之一取代：烷基、烯基、卤代、卤代烯基、氰基、硝基、芳基、环烷基、杂环基、杂芳基、氧代、三甲基硅烷基、$—OR^{14}$、$—OC(O)—R^{14}$、$—N(R^{14})_2$、$—C(O)R^{14}$、$—C(O)OR^{14}$、$—C(O)N(R^{14})_2$、$—N(R^{14})C(O)OR^{16}$、$—N(R^{14})C(O)R^{16}$、$—N(R^{14})S(O)_tR^{16}$(其中t为1至2)、$—S(O)_tOR^{16}$(其中t为1至2)、$—S(O)_pR^{16}$(其中p为0至2)和$—S(O)_tN(R^{14})_2$(其中t为1至2)，其中每个$R^{14}$独立地为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基；并且每个$R^{16}$为烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基。

[0050] “芳基”是指包含氢、6至18个碳原子和至少一个芳族环组成的烃环体系残基。出于本发明的目的，芳基残基可以是单环、双环、三环或四环的环体系，其可以包括稠合或桥连环体系。芳基残基包括但不限于衍生自苊蒽、苊、苊菲、蒽、芴、苯、**䓛**、荧蒽、茀、as-二环戊熳并苯、s-二环戊熳并苯、茚满、茚、萘、苣、菲、昔苯、芘和联三苯叉的芳基残基。除非说明书中明确另有说明，否则术语“芳基”或前缀“ar-”(如在“芳烷基(aralkyl)”中)意在包括任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基取代的芳基残基：烷基、烯基、卤代、卤代烷基、卤代烯基、氰基、硝基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳基烷基、$—R^{15}—OR^{14}$、$—R^{15}—OC(O)—R^{14}$、$—R^{15}—N(R^{14})_2$、$—R^{15}—C(O)R^{14}$、$—R^{15}—C(O)OR^{14}$、$—R^{15}—C(O)N(R^{14})_2$、$—R^{15}—N(R^{14})C(O)OR^{16}$、$—R^{15}—N(R^{14})C(O)R^{16}$、$—R^{15}—N(R^{14})S(O)_tR^{16}$(其中t为1至2)、$—R^{15}—N=C(OR^{14})R^{14}$、$—R^{15}—S(O)_tOR^{16}$(其中t为1至2)、$—R^{15}—S(O)_pR^{16}$(其中p为0至2)、和$—R^{15}—S(O)_tN(R^{14})_2$(其中t为1至2)，其中每个$R^{14}$独立地为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基；每个$R^{15}$独立地为直接键或直链或支链亚烷基或亚烯基链；并且每个$R^{16}$为烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基。

[0051] “芳烷基”是指式$—R_b—R_c$的残基，其中$R_b$为如上文所定义的亚烷基链并且$R_c$为一种或多种如上文所定义的芳基残基，例如苄基、二苯基甲基等。芳烷基残基的亚烷基链部分可以任选地如上文对亚烷基链所描述那样被取代。芳烷基残基的芳基部分可以任选地如上文对芳基基团所描述那样被取代。

[0052] “环烷基”是指仅由碳和氢原子组成的稳定的非芳族单环或多环烃残基，其可以包括稠合或桥连环体系，具有3至15个碳原子，优选具有3至10个碳原子，并且其为饱和或不饱和的，并且通过单键连接至分子的其余部分。单环残基包括，例如，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。多环残基包括，例如，金刚烷基、降冰片基、十氢萘基等。除非说明书中明确另有说明，否则术语“环烷基”意在包括任选地被一个或多个独立地选自以下的取代基取代的环烷基残基：烷基、烯基、卤代、卤代烷基、卤代烯基、氰基、硝基、氧代、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、$—R^{15}—OR^{14}$、$—R^{15}—OC(O)—R^{14}$、$—R^{15}—N(R^{14})_2$、$—R^{15}—C(O)R^{14}$、$—R^{15}—C(O)OR^{14}$、$—R^{15}—C(O)N(R^{14})_2$、$—R^{15}—N$

$(R^{14})C(O)OR^{16}$、$—R^{15}—N(R^{14})C(O)R^{16}$、$—R^{15}—N(R^{14})S(O)_tR^{16}$(其中t为1至2)、$—R^{15}—N=C(OR^{14})R^{14}$、$—R^{15}—S(O)_tOR^{16}$(其中t为1至2)、$—R^{15}—S(O)_pR^{16}$(其中p为0至2)、和$—R^{15}—S(O)_tN(R^{14})_2$(其中t为1至2),其中每个$R^{14}$独立地为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基;每个$R^{15}$独立地为直接键或直链或支链亚烷基或亚烯基链;并且每个$R^{16}$为烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基。

[0053] “卤代”是指溴代、氯代、氟代或碘代。

[0054] “卤代烷基”是指如上文所定义的烷基残基,其被一个或多个如上文所定义的卤代残基取代,例如三氟甲基、二氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、1-氟甲基-2-氟乙基、3-溴-2-氟丙基、1-溴甲基-2-溴乙基等。卤代烷基残基的烷基部分可以任选地如上文对烷基基团所定义那样被取代。

[0055] “杂环基”是指稳定的3至18元非芳族环残基,其由2至12个碳原子和选自氮、氧和硫的1至6个杂原子组成。除非说明书中明确另有说明,否则杂环基残基可以为单环、双环、三环或四环的环体系,其可以包括稠合或桥连环体系;并且杂环基残基中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化;氮原子可以任选地被季铵化;并且杂环基残基可以部分或完全饱和。这样的杂环基残基的实例包括但不限于二氧戊环基、噻吩基[1,3]二噻烷基、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢糠基、三噻烷基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、硫吗啉基、1-氧代-硫代吗啉基和1,1-二氧代-硫代吗啉基。除非说明书中明确另有说明,否则术语“杂环基”意在包括如上文所定义的杂环基残基,其任选地被一个或多个选自以下的取代基取代:烷基、烯基、卤代、卤代烷基、卤代烯基、氰基、氧代、硫代、硝基、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、$—R^{15}—OR^{14}$、$—R^{15}—OC(O)—R^{14}$、$—R^{15}—N(R^{14})_2$、$—R^{15}—C(O)OR^{14}$、$—R^{15}—C(O)OR^{14}$、$—R^{15}—C(O)N(R^{14})_2$、$—R^{15}—N(R^{14})C(O)OR^{16}$、$—R^{15}—N(R^{14})C(O)R^{16}$、$—R^{15}—N(R^{14})S(O)_tR^{16}$(其中t为1至2)、$—R^{15}—N=C(OR^{14})R^{14}$、$—R^{15}—(S(O)_tOR^{16}$(其中t为1至2)、$—R^{15}—S(O)_pR^{16}$(其中p为0至2)、和$—R^{15}—S(O)_tN(R^{14})_2$(其中t为1至2),其中每个$R^{14}$独立地为氢、烷基、烯基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基;每个$R^{15}$独立地为直接键或直链或支链亚烷基或亚烯基链;并且每个$R^{16}$为烷基、烯基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基。

[0056] “N-杂环基”是指如上文所定义的杂环基残基,其含有至少一个氮并且其中杂环基残基与分子的其余部分的连接点是通过在杂环基残基中的氮原子。N-杂环基残基可以任选地如上文对杂环基残基所描述那样被取代。

[0057] “杂环基烷基”是指式$—R_bR_h$的残基,其中$R_b$为如上文所定义的亚烷基链并且$R_h$为如上文所定义的杂环基残基,并且如果杂环基为含氮的杂环基,则该杂环基可以在氮原子处连接至亚烷基链。杂环基烷基残基的亚烷基链可以任选地如上文对亚烷基链所定义那样被取代。杂环基烷基残基的杂环基部分可以任选地如上文对杂环基基团所定义那样被取代。

[0058] “杂芳基”是指5-至14-元环体系残基,包含氢原子,1至13个碳原子和选自氮、氧和

硫的1至6个杂原子和至少一个芳族环。出于本发明的目的,杂芳基残基可以为单环、双环、三环或四环的环体系,其可以包括稠合或桥连环体系;并且杂芳基残基中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化;氮原子可以任选地被季铵化。实例包括但不限于:氮杂环庚三烯基、吖啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吲哚基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二氧杂环庚三烯基、1,4-苯并二噁烷基、苯并萘并呋喃基、苯并噁唑基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并二噁英基、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基(benzothienyl/benzothiophenyl)、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咔唑基、噌啉基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、呋喃酮基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基、吲哚基、吲唑基、异吲哚基、吲哚啉基、异吲哚啉基、异喹啉基、吲哚嗪基、异噁唑基、萘啶基、噁二唑基、2-氧代氮杂环庚三烯基、噁唑基、氧杂环丙基、1-氧化吡啶基、1-氧化嘧啶基、1-氧化吡嗪基、1-氧化哒嗪基、1-苯基-1H-吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、酞嗪基、蝶啶基、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡咯基、喹唑啉基、喹喔啉基、喹啉基、奎宁环基、异喹啉基、四氢喹啉基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基和噻吩基(thiophenyl/thienyl)。除非在说明书中明确另有规定,否则术语“杂芳基”意在包括如上文所定义的杂芳基残基,其任选地被一个或多个选自以下的取代基取代:烷基、烯基、烷氧基、卤代、卤代烷基、卤代烯基、氰基、氧代、硫代、硝基、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、—$R^{15}$—$OR^{14}$、—$R^{15}$—$OC(O)$—$R^{14}$、—$R^{15}$—$N(R^{14})_2$、—$R^{15}$—$C(O)R^{14}$、—$R^{15}$—$C(O)OR^{14}$、—$R^{15}$—$C(O)N(R^{14})_2$、—$R^{15}$—$N(R^{14})C(O)OR^{16}$、—$R^{15}$—$N(R^{14})C(O)R^{16}$、—$R^{15}$—$N(R^{14})S(O)_tR^{16}$(其中t为1至2)、—$R^{15}$—$N=C(OR^{14})R^{14}$、—$R^{15}$—$S(O)_tOR^{16}$(其中t为1至2)、—$R^{15}$—$S(O)_pR^{16}$(其中p为0至2)、和—$R^{15}$—$S(O)_tN(R^{14})_2$(其中t为1至2),其中每个$R^{14}$独立地为氢、烷基、烯基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基;每个$R^{15}$独立地为直接键或直链或支链亚烷基或亚烯基链;并且每个$R^{16}$为烷基、烯基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基。

[0059] “N-杂芳基”是指如上文所定义的杂芳基残基,其含有至少一个氮并且其中杂芳基残基与分子的其余部分的连接点是通过在杂芳基残基中的氮原子。N-杂芳基残基可以任选地如上文对杂芳基残基所描述那样被取代。

[0060] “杂芳基烷基”是指式—$R_bR_i$的残基,其中$R_b$为如上文所定义的亚烷基链并且$R_i$为如上文所定义的杂芳基残基。该杂芳基烷基残基的杂芳基部分可以任选地如上文对杂芳基基团所定义那样被取代。该杂芳基烷基残基的亚烷基链部分可以任选地如上文对亚烷基链所定义那样被取代。

[0061] “任选的”或“任选地”意指随后描述的情况事件可以或可以不发生,并且意指描述包括所述事件或情况发生的情形以及它不发生的情形。例如,“任选地被取代的芳基”意指芳基残基可以或可以不被取代,并且意指描述包括被取代的芳基残基和没有取代的芳基残基。当一个官能团被描述为“任选地被取代”时,该官能团上的取代基转而也“任选地被取代”,依此类推,出于本发明的目的,这样的迭代被限制为五次,优选这样的迭代被限制为两次。

[0062] “药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于任何已经被美国食品与药品管理局批准的用于人类或家养动物可接受的佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释

剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、湿润剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。

[0063] “药学上可接受的盐”包括酸和碱加成盐。

[0064] “药学上可接受的酸加成盐”是指那些保留了在生物学上或在其他方面是不期望的游离碱的生物有效性和性质的盐,以及与无机酸形成的盐,如,但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,以及与有机酸形成的盐,如,但不限于,乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、粘酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘液酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、帕莫酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一烯酸等。

[0065] “药学上可接受的碱加成盐”是指那些保留了在生物学上或在其他方面是不期望的游离酸的生物有效性和性质的盐。这些盐是通过向游离酸添加无机碱或有机碱制备。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等。无机盐的实例包括铵、钠、钾、钙和镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下的盐:伯、仲和叔胺,被取代的胺,包括天然存在的被取代的胺、环胺和碱性离子交换树脂,如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、N,N-二甲基乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、苯乙胺、苄星、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、氨丁三醇、嘌呤类、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。有机碱的实例包括异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

[0066] “药物组合物”是指化合物和通常本领域所接受的用于递送生物活性的化合物至哺乳动物,例如人类的介质的制剂。这样的介质可以包括药学上可接受的载体、稀释剂、或赋形剂。

[0067] “治疗有效量”是指当施用至哺乳动物,例如人类时,足以在患有疾病或病症的哺乳动物,例如人类中有效治疗感兴趣的疾病或病症的化合物的量。构成“治疗有效量”的化合物的量将取决于化合物、疾病或病症及其严重程度、施用方式和待治疗的哺乳动物的年龄而改变,但可以由本领域普通技术人员考虑到他的自身知识和本公开内容常规地确定。

[0068] 本文所公开的化合物或其药学上可接受的盐可以包含一个或多个不对称中心,因此可以产生对映异构体、非对映异构体和其他立体异构体形式,这些形式可以从绝对立体化学角度被定义为(R)-或(S)-,或对于氨基酸为(D)-或(L)-。本文所公开的化合物意在包括所有这样的可能的异构体,以及它们的外消旋和光学纯形式。光学活性(+)和(-)、(R)-和(S)-,或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂制备,或使用常规的技术进行拆分,例如色谱法和分级结晶。用于制备/分离单个对映异构体的常规技术包括从合适的光学纯前体的手性合成或使用例如手性高压液相色谱(HPLC)对外消旋体(或盐或衍生物的外消旋体)的拆分。除非另有规定,否则当本文所描述的化合物含有烯属双键或其他几何不对称中心时,旨在该化合物包括E和Z几何异构体二者。同样,旨在包括所有的互变异构形式。

[0069] “立体异构体”是指通过相同的键键合的相同原子组成,但具有不同的三维结构的化合物,其不可互换。本发明考虑了各种立体异构体及其混合物,并且包括“对映异构体”,这是指两个立体异构体,其分子为彼此不可重叠的镜像。

[0070] 取代基基团中括号的使用在本文中用以节省空间。因此,在取代基基团中括号的使用表明括号内的基团直接连接至括号前的原子。

[0071] 式(I)的化合物中,一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^2$;并且$R^2$独立地为烷基或杂环基烷基。在该实施方案中,一个实施方案为选自以下的式(I)的化合物:5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸异丙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸4-甲基戊酯;和5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸(5-甲基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)甲酯。

[0072] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^2$;并且$R^2$为卤代烷基或被取代的芳基。在该实施方案中,一个实施方案为选自以下的式(I)的化合物:5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2,2,2-三氟乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2,2,2-三氯乙基酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-溴乙酯;和2-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)苯甲酸。

[0073] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^3$—O$R^2$;$R^2$为任选地被取代的杂环基烷基;并且$R^3$为任选地被取代的亚烷基链。在该实施方案中,一个实施方案为式(I)的化合物,其为5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸3-(四氢-2H-吡喃-2-基氧基)丙酯。

[0074] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^3$—OC(O)—N($R^5$)$R^6$;每个$R^2$独立地为烷基、卤代烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;$R^3$为任选地被取代的亚烷基链;并且$R^5$为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基;并且$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^3$;和/或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选地被取代的N-杂芳基。在该实施方案中,一个实施方案为选自以下的式(I)的化合物:5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸1-(苄基(甲基)氨基甲酰氧基)乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸1-((2-乙氧基-2-氧代乙基)(甲基)氨基甲酰氧基)乙酯;1-(1-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙基)吡咯烷-1,2-二甲酸4-(2S)-2-苄酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸1-(4-苯基环已烷羰基氧基)乙酯;3-苯基吡咯烷-1-甲酸1-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙酯;3,4-二氢异喹啉-2(1H)-甲酸1-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙酯;哌啶-1-甲酸1-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙酯;吗啉-4-甲酸1-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙酯;4-(1-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙基)哌嗪-1,4-二甲酸1-叔丁酯;和5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸1-(二环已基氨基甲酰氧基)乙酯。

[0075] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^3$—N($R^5$)$R^6$;$R^3$为任选地被取代的亚烷基链;并且$R^5$为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基;并且$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^4$;和/或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选地被取代的N-杂芳基。在该实施方案中,一个实施方案为选自以下的式

(I)的化合物:5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-(二甲基氨基)乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-吗啉基乙酯;或5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸3-吗啉基丙酯。

[0076] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^3$—N($R^4$)C(O)O$R^5$;$R^3$为任选地被取代的亚烷基链;并且$R^4$为任选地被取代的烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;并且$R^5$为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基。

[0077] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^3$—C(O)O$R^5$;$R^3$为任选地被取代的亚烷基链;并且$R^5$为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基。

[0078] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—O—$R^3$—C(O)N($R^5$)$R^6$;$R^3$为任选地被取代的亚烷基链;并且$R^5$为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基;并且$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^4$;或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选地被取代的N-杂芳基。在该实施方案中,一个实施方案为选自以下的式(I)的化合物:5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-(苄基(甲基)氨基)-2-氧代乙酯;4-(2-(5-十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙酰基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-(二环己基氨基)-2-氧代乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-(4-环己基哌嗪-1-基)-2-氧代乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-氧代-2-(4-苯基哌嗪-1-基)乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-((2-乙氧基-2-氧代乙基)(甲基)氨基)-2-氧代乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-氧代-2-(哌啶-1-基)乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-吗啉基-2-氧代乙酯;5-(十四烷氧基)呋喃-2-甲酸2-(3,4-二氢异喹啉-2(1H)-基)-2-氧代乙酯;和1-(2-(5-(十四烷氧基)呋喃-2-羰基氧基)乙酰基)吡咯烷-2-甲酸(S)-苄酯。

[0079] 式(I)的化合物中,另一个实施方案为式(I)的化合物,其中:$R^1$为—N($R^5$)$S(O)_2$—$R^4$;$R^4$为任选地被取代的烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;并且$R^5$独立地为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基。在该实施方案中,一个实施方案为式(I)的化合物,其为5-(十四烷氧基)-N-甲苯磺酰基呋喃-2-甲酰胺。

[0080] 在药物组合物中,一个实施方案为其中该药物组合物为经口组合物,其包含有效量的式(I)化合物,或其药学上可接受的盐。

[0081] 药物组合物

[0082] 式I化合物,或其药学上可接受的盐,可以为适合用于施用至受试者的组合物的形式。通常,这样的组合物为包含式I化合物(或其药学上可接受的盐)和一种或多种药学上可接受或生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂的"药物组合物"。在一些情况下,式I化合物(或其药学上可接受的盐)以治疗有效量存在。药物组合物可以被用于本公开内容的方法中;因此,例如,可以将药物组合物施用至受试者,以实践本文所描述的治疗性和预防性的方法和用途。

[0083] 本公开内容的药物组合物可以被配制为与预期的施用方法或途径相容;本文中提出了示例性的施用途径。此外,药物组合物可以与本文所描述的其他治疗性活性剂或化合物(例如,降糖剂)组合使用,以治疗或预防本公开内容所考虑的疾病、障碍和病症。

[0084] 药物组合物典型地包含治疗有效量的式I化合物(或其药学上可接受的盐)和一种或多种药学上和生理学上可接受的配制试剂。合适的药学上可接受或生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于抗氧化剂(例如抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如苯甲醇,甲基对羟基苯甲酸酯类,对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯)、乳化剂、悬浮剂、分散剂、溶剂、填充剂、膨胀剂、洗涤剂、缓冲剂、溶媒、稀释剂和/或佐剂。例如,合适的溶媒可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲盐水,可以补充有药物组合物中常见的用于胃肠外施用的其他物质。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是另外的示例性溶媒。本领域技术人员将容易意识到可用于药物组合物和剂型中的各种缓冲剂。典型的缓冲剂包括但不限于药学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。作为实例,缓冲剂组分可以是水可溶性的材料如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸,及其盐。可接受的缓冲剂包括例如Tris缓冲剂、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉基)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)和N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)。

[0085] 在配制药物组合物之后,它可以以溶液、混悬剂、凝胶剂、乳剂、固体、脱水或冻干粉末的形式储存在无菌小瓶中。这样的制剂可以以即用型形式、在使用前需要重构的冻干形式、在使用前需要稀释的液体形式或其他可接受形式储存。在一些实施方案中,将药物组合物提供在一次性容器(例如,一次性小瓶、安瓿瓶、注射器或自动注射器(类似于例如EpiPen™))中,而在其他实施方案中提供多次使用容器(例如,多次使用小瓶)。可以将任何药物递送设备用于递送式I化合物(或其药学上可接受的盐),包括植入物(例如,可植入泵)和导管系统,这二者都是技术人员所熟知的。通常皮下或肌内施用的储库型注射剂也可以用于在限定的时间内释放本文中所公开的多肽。储库型注射剂通常是基于固体的或基于油的,并且通常包含本文提出的至少一种制剂组分。本领域的普通技术人员熟悉储库型注射剂的可能的制剂和用途。

[0086] 药物组合物可以以无菌可注射水性或油质(oleagenous)混悬剂的形式存在。该混悬剂可以根据已知技术使用本文中提到的那些合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可注射配制剂也可以是在非毒性的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮剂,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括水、林格(Ringer)氏液、等渗氯化钠溶液、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其合适的混合物。此外,无菌、非挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用的任何温和的非挥发油包括合成甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸用于可注射物的制备中。通过包括延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶),可以实现特别的可注射制剂的延长吸收。

[0087] 含有活性成分(例如,式I化合物(或其药学上可接受的盐))的药物组合物可以以适合用于经口使用的形式,例如作为片剂、胶囊剂、药片、锭剂、水性或油性混悬剂、可分散粉末剂或颗粒剂、乳剂、硬或软胶囊剂、或糖浆、溶液、微珠或酏剂。旨在经口使用的药物组合物可以根据本领域已知的用于药物组合物的制造的任何方法来制备,并且这样的组合物可以含有一种或多种试剂,例如,甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂,以提供药学上精制和适口的配制剂。片剂、胶囊剂等含有与适合用于片剂的制造的非毒性的药学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是例如稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸

钠;制粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉,或海藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶,和润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

[0088] 适合用于经口施用的片剂、胶囊等可以是未包衣的或通过已知技术包衣以延迟胃肠道中的崩解和吸收并且从而提供持久作用。例如,可以采用延时材料如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯。它们也可以通过本领域已知的技术包衣以形成用于受控释放的渗透治疗性片剂。另外的试剂包括可生物降解或生物相容的颗粒或聚合物质,如聚酯、多胺酸、水凝胶、聚乙烯基吡咯烷酮、聚酸酐、聚乙醇酸、乙烯乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白或丙交酯/乙交酯共聚物、聚丙交酯/乙交酯共聚物或乙烯乙酸乙烯酯共聚物,以控制施用的组合物的递送。例如,口服药剂可以包埋在通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,分别通过使用羟甲基纤维素或明胶-微胶囊或聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,或在胶体药物递送系统中。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。制备脂质体的方法描述于例如美国专利第4,235,871、4,501,728和4,837,028号中。上述提及的制剂的制备方法对本领域的技术人员将是显而易见的。

[0089] 用于经口使用的制剂也可以被呈现为硬明胶胶囊剂,其中活性成分与惰性固体稀释剂,例如碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素混合,或被呈现为软明胶胶囊剂,其中活性成分与水或油介质,例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0090] 水性混悬剂含有与适合用于其制造的赋形剂混合的活性物质。这样的赋形剂可以是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯基吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂,例如天然存在的磷脂(例如卵磷脂),或氧化烯烃与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯),或氧化乙烯与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七乙烯氧基十六醇),或氧化乙烯与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如聚氧亚乙基山梨醇单油酸酯),或氧化乙烯与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如聚乙烯失水山梨醇单油酸酯)。水性混悬剂也可以含有一种或多种防腐剂。

[0091] 可以通过将活性成分悬浮在植物油,例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油中,或悬浮在矿物油,如液体石蜡中来配制油性混悬剂。油性混悬剂可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以添加如上文提出的那些甜味剂,和矫味剂以提供适口的经口配制剂。

[0092] 适合通过添加水来制备水性混悬剂的可分散粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。本文示例了合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂。

[0093] 本公开内容的药物组合物也可以是水包油乳剂的形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或这些的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的胶,例如,阿拉伯胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂,和衍生自脂肪酸的酯或偏酯;己糖醇酐,例如,失水山梨醇单油酸酯;和偏酯与氧化乙烯的缩合产物,例如,聚氧亚乙基失水山梨醇单油酸酯。

[0094] 制剂还可以包括载体,以保护组合物防止快速降解或从体内消除,如受控释放的制剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微胶囊化的递送系统。例如,可以采用延时材料如单独的单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯,或与蜡组合。

[0095] 在一些情况下,不将式I化合物(或其药学上可接受的盐)配制来用于局部施用。

[0096] 方法

[0097] 本公开内容的方法包括向对其有需要的个体施用治疗有效量的式I化合物,或其药学上可接受的盐。

[0098] “治疗有效量”是指单独或作为药物组合物的一部分,在单个剂量中或作为系列剂量的一部分,以在施用至患者时能够对疾病、障碍或病症的任何症状、方面或特性具有任何可检测的、积极的作用的量向受试者施用药剂。治疗有效量可以通过测量相关的生理作用来确定。在一些情况下,例如,在高血糖病症的情况下,可以使用降低或减少血糖或改善葡萄糖耐量试验来确定药剂的量对于治疗高血糖病症是否能有效。结合给药方案和受试者病症的诊断分析等,可以调整治疗有效量。除非明确另有说明,否则“式I化合物”意在包括式I化合物的药学上可接受的盐。

[0099] 在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是当以一个或多个剂量施用时,足以减少或降低空腹血浆葡萄糖(FPG)的任何水平(例如,基线水平)的量,其中,例如该量足以将高于200mg/dl的FPG水平降低至低于200mg/dl,其中该量足以将介于175mg/dl与200mg/dl之间的FPG水平降低至低于起始水平,其中该量足以将介于150mg/dl与175mg/dl之间的FPG水平降低至低于起始水平,其中该量足以将介于125mg/dl与150mg/dl之间的FPG水平降低至低于起始水平等等(例如,将FPG水平降低至低于125mg/dl,至低于120mg/dl,至低于115mg/dl,至低于110mg/dl等)。

[0100] 在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是当以一个或多个剂量施用时,足以减少或降低血红蛋白A1c(HbA1c)水平超过约10%至9%、超过约9%至8%、超过约8%至7%、超过约7%至6%、超过约6%至5%等的量。在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是足以减少或降低HbA1c水平约0.1%、0.25%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、33%、35%、40%、45%、50%或更多的量。

[0101] 在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是当以一个或多个剂量施用时,足以导致胰岛素水平在正常范围内的量。

[0102] 在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是当以一个或多个剂量施用时,足以导致血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平在正常范围内的量。在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是当以一个或多个剂量施用时,相比于治疗前的血清ALT水平,足以降低血清ALT水平至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%或超过50%的量。在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是当以一个或多个剂量施用时,足以导致血清天冬氨酸转氨酶(AST)在正常范围内的量。在一些情况下,式I化合物的治疗有效量是当以一个或多个剂量施用时,相比于治疗前的血清AST水平,足以降低血清AST水平至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%或超过50%的量。

[0103] 在一些情况下,式I化合物的有效量是当以一个或多个剂量施用至受试者时,产生相对于健康受试者期望的结果的量。例如有效剂量可以是当施用至具有升高的血糖和/或血浆胰岛素的受试者时,相对于健康受试者的血糖和胰岛素实现期望的降低,降低至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或超过80%的剂量。

[0104] 施用途径

[0105] 合适的施用途径包括经口、直肠、经鼻、肺、局部、皮下、肌内、腹膜内、静脉内、皮

内、鞘内和硬膜外。在一些情况下,施用途径是经口。

[0106] 剂量

[0107] 式I化合物可以以取决于例如施用目标(例如,期望的消除程度);待治疗的受试者的年龄、体重、性别、和健康和身体状况;化合物和/或被施用的制剂的特性;施用途径;和疾病、障碍、病症的特性或其症状(例如,葡萄糖/胰岛素失调的严重程度和障碍的阶段)的量施用至受试者。给药方案还可以考虑与被施用的(一种或多种)药剂相关的任何不良反应的存在、特性和程度。可以容易地从例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如,动物模型)和技术人员已知的其他方法确定有效剂量量和剂量方案。

[0108] 通常,给药参数规定剂量量低于对受试者可能是不可逆毒性的量(即最大耐受剂量,"MTD")且不低于对受试者产生可测量的作用所需的量。通过例如与吸收、分布、代谢和排泄相关的药代动力学和药效学参数("ADME"),考虑施用途径和其他因素确定这样的量。

[0109] 有效剂量(ED)是在服用药剂的部分受试者中产生治疗性反应或期望效果的药剂的剂量或量。药剂的"半数有效剂量"或ED50是指在药剂所施用的人群的50%中产生治疗性反应或期望效果的药剂的剂量或量。尽管ED50通常用作对药剂效果的合理预期的量度,但它不一定是临床医师考虑所有相关因素可认为合适的剂量。因此,在一些情况下,有效量大于计算的ED50,在其他情况下,有效量小于计算的ED50,并且在其他情况下,有效量与计算的ED50相同。

[0110] 合适的剂量水平通常将为约0.001至100mg/kg患者体重/天,其可以以单次或多次剂量施用。

[0111] 在一些情况下,剂量水平将为约0.01至约25mg/kg/天,并且在其他实施方案中为每日约0.05至约10mg/kg/天。合适的剂量水平可以为约0.01至25mg/kg/天,或约0.05至10mg/kg/天,或约0.1至5mg/kg/天。在此范围内,剂量可以为0.005至0.05、0.05至0.5、或0.5至5.0mg/kg/天。

[0112] 在一些情况下,式(I)化合物、其药学上可接受的盐、溶剂化物、多晶型物、前药、代谢物、立体异构体,或异构体的治疗有效量为约25mg/天、约50mg/天、约75mg/天、约100mg/天、约150mg/天、约200mg/天、或约400mg/天。在一些实施方案中,式(I)化合物、其药学上可接受的盐、溶剂化物、多晶型物、前药、代谢物、立体异构体或异构体的治疗有效量为约50mg/天、约100mg/天、约150mg/天、约200mg/天、或约400mg/天。在一些实施方案中,式(I)化合物、其药学上可接受的盐、溶剂化物、多晶型物、前药、代谢物、立体异构体或异构体的治疗有效量为最多25mg/天、最多50mg/天、最多75mg/天、最多100mg/天、最多150mg、最多200mg、最多400mg/天、最多600mg/天、最多800mg/天、或最多1000mg/天。在一些实施方案中,式(I)化合物、其药学上可接受的盐、溶剂化物、多晶型物、前药、代谢物、N-氧化物、立体异构体或异构体的治疗有效量为最多400mg/天。

[0113] 对于经口药剂的施用,组合物可以以片剂、胶囊剂等形式提供,其含有1.0至1000毫克的活性成分,特别是1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0和1000.0毫克的活性成分。例如,可以以每天1至4次,并且经常每天一次或两次的方案施用式I化合物。

[0114] 取决于化合物的药代动力学(例如半衰期)和药效学反应(例如化合物的治疗效果的持续时间),可以以适当的频率重复式I化合物的剂量,该频率可以在每天一次至每三个

月一次的范围内。在一些情况下,常常介于每周一次与每3个月一次之间重复给药。在其他情况下,大约每月施用一次式I化合物。

[0115] 在某些实施方案中,式I化合物的剂量包含在“单位剂型”中。短语“单位剂型”是指物理离散的单位,每个单位含预定量的式I化合物,单独或与一种或多种另外的药剂组合,足以产生期望效果。要意识到的是,单位剂型的参数将取决于具体的药剂和要实现的效果。

[0116] 组合疗法

[0117] 本公开内容考虑了式I化合物与一种或多种另外的药剂(例如,一种或多种另外的活性治疗性药剂)或其他预防性或治疗性方式的组合使用。在这样的组合疗法中,各种活性药剂常常具有不同的作用机制。通过允许一种或多种药剂的剂量减少,从而减少或消除与一种或多种药剂相关的不良反应,这样的组合疗法可以是特别有利;此外,这样的组合疗法可以对基础疾病、障碍或病症具有协同治疗性或预防性效果。

[0118] 本文所使用的“组合”意在包括可以单独施用的疗法,例如,单独配制用于单独施用(例如,可以在试剂盒中提供),以及可以在单个配制剂中一起施用的疗法(即“共配制剂(co-formulation)”)。

[0119] 在某些情况下,式I化合物和至少一种另外的药剂是按顺序施用或应用,例如,其中一种药剂先于一种或多种其他药剂施用。在其他情况下,式I化合物和至少一种另外的药剂同时施用,例如,其中两种或更多种药剂在或约同一时间施用;所述两种或更多种药剂可以存在于两种或更多种单独的制剂中或组合成单个的制剂(即共配制剂)。无论两种或更多种药剂按顺序还是同时施用,出于本公开内容的目的,它们都被视为组合施用。

[0120] 式I化合物可以与在本文所提出的障碍或病症的治疗中有用的其他药剂组合使用,包括那些通常施用至患有肥胖症、进食障碍、高血糖症、高胰岛素血症、葡萄糖不耐受和其他葡萄糖代谢障碍的受试者的药剂。

[0121] 本公开内容考虑与多种药剂(及其类别)的组合疗法,包括1)胰岛素、胰岛素模拟物和刺激胰岛素分泌的药剂,包括磺酰脲类(例如氯磺丙脲、托拉磺脲、醋磺己脲、甲苯磺丁脲、格列本脲、格列美脲、格列吡嗪)和氯茴苯酸(例如美格列奈、瑞格列奈和那格列奈);2)双胍类(例如二甲双胍,及其药学上可接受的盐,尤其盐酸二甲双胍及其延长释放制剂,如Glumetza™、Fortamet™和GlucophageXR™)和通过促进葡萄糖利用、减少肝葡萄糖产生和/或减少肠道葡萄糖输出而起作用的其他药剂;3)α-葡萄糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇)和可减慢碳水化合物消化,从而减慢从肠道吸收并减少餐后高血糖症的其他药剂;4)噻唑烷二酮类(例如罗格列酮、曲格列酮、吡格列酮、格列吡嗪、巴格列酮、利格列酮、萘格列酮、AMG 131、MBX2044、米格列酮、洛贝格列酮、IDR-105、曲格列酮、恩格列酮、环格列酮、adaglitazone、达格列酮,增强胰岛素作用(例如,通过胰岛素增敏),包括胰岛素,以及胰岛素模拟物(例如,德谷胰岛素(insulin degludec)、甘精胰岛素(insulin glargine)、赖脯胰岛素(insulin lispro)、地特胰岛素(insulin detemir)、谷赖胰岛素(insulin glulisine)和每种的可吸入制剂),从而促进在外周组织中的葡萄糖利用;5)胰高血糖素样肽,包括DPP-IV抑制剂(例如,阿格列汀、奥格列汀、利格列汀、维格列汀和西格列汀)和胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和GLP-1激动剂和类似物(例如,艾塞那肽(BYETTA和ITCA650(皮下插入的渗透泵,其可在12个月期间递送艾塞那肽类似物;Intarcia,Boston,Mass.))和GLP-1受体激动剂(例如度拉鲁肽(dulaglutide)、司美格鲁肽(semaglutide)、阿

必鲁肽(albiglutide)、艾塞那肽、利拉糖肽、利西拉肽(lixisenatide)、他司鲁肽(taspoglutide)、CJC-1131和BIM-51077,包括其鼻内、透皮和每周一次的制剂);和6)和抗DPP-IV类似物(肠促胰岛素模拟物)、PPARγ激动剂、PPARα激动剂如非诺贝酸衍生物(例如吉非贝齐、氯贝特、环丙贝特、非诺贝特、苯扎贝特)、双效PPAR激动剂(例如ZYH2、ZYH1、GFT505、西格列他(chiglitazar)、莫格列扎、阿格列扎、索格列扎和那格列扎)、泛作用PPAR激动剂、PTP1B抑制剂(例如ISIS-113715和TTP814)、SGLT抑制剂(例如ASP1941、SGLT-3、恩格列净(empagliflozin)、达格列净(dapagliflozin)、坎格列净(canagliflozin)、BI-10773、PF-04971729、remogloflozin、TS-071、托格列净(tofogliflozin)、伊格列净(ipragliflozin)和LX-4211)、促胰岛素分泌剂、血管紧张素转化酶抑制剂(例如阿拉普利、贝那普利(benazepril)、卡托普利、西罗普利、西拉普利、地拉普利、依那普利、依那普利拉、福辛普利、咪达普利、赖诺普利、莫维普利、培哚普利、喹那普利、雷米普利、螺普利、替莫普利或群哚普利(trandolapril))、血管紧张素II受体拮抗剂(例如氯沙坦、缬沙坦、坎地沙坦、奥美沙坦、替米沙坦(telmesartan));等。

[0122] 受试者

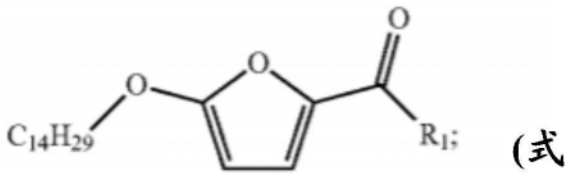
[0123] 适合用本公开内容的方法治疗的受试者包括患有代谢障碍的个体。适合用本公开内容的方法治疗的受试者包括肥胖个体。适合用本公开内容的方法治疗的受试者包括患有2型II型糖尿病的个体。适合用本公开内容的方法治疗的受试者包括患有糖尿病视网膜病变的个体。适合用本公开内容的方法治疗的受试者包括患有非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的个体。适合使用本公开内容方法治疗的受试者包括患有非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的个体。

[0124] 在一些情况下,具体排除患有和/或被诊断为患有非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的个体。在一些情况下,明确排除患有和/或被诊断为患有非酒精性脂肪性肝炎(NAS)的个体。

[0125] 本公开内容的非限制性方面的实例

[0126] 上文所描述的本发明主题的方面,包括实施方案,单独或与一个或多个其他方面或实施方案组合,可以是有益的。在不限制前述描述的情况下,下文提供了本公开的某些非限制性方面。正如对于本领域的技术人员阅读本公开后将是显而易见的那样,每个单独编号的方面可以与任何在前或在后的单独编号的方面一起使用或组合。这旨在为了所有这样的方面的组合提供支持,并且不限于下文明确提供的方面的组合:

[0127] 方面1.在个体中治疗代谢障碍的方法,该方法包括对该个体施用有效量的式I化合物:

[0128] 

(式I)

[0129] 其中:$R^1$为—O—$R^2$、—O—$R^3$—O$R^2$、—O—$R^3$—OC(O)—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^4$)C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)N($R^5$)$R^6$或—N($R^5$)$S(O)_2$—$R^4$;

[0130] 每个$R^2$独立地为烷基、卤代烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^3$独立地为任选地被取代的亚烷基链;$R^4$为任选地被取代的烷基、

任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^5$独立地为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基;每个$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^4$;或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选地被取代的N-杂芳基;该式I化合物为单个的立体异构体或为其混合物或其药学上可接受的盐的形式。

[0131] 方面2.方面1的方法,其中该化合物为5-(十四烷氧基)-2-糠酸。

[0132] 方面3.方面1或方面2的方法,其中代谢障碍为胰岛素抵抗、高血糖症、2型糖尿病、肥胖症、脂肪性肝病、葡萄糖不耐受、高胰岛素血症、代谢综合征或高血压。

[0133] 方面4.方面1-3中任一项的方法,其中所述代谢障碍包括胰岛素抵抗。

[0134] 方面5.方面1-3中任一项的方法,其中所述代谢障碍包括代谢综合征。

[0135] 方面6.方面1-3中任一项的方法,其中所述代谢障碍包括2型糖尿病。

[0136] 方面7.方面1-6中任一项的方法,其中个体具有>30.0的身体质量指数。

[0137] 方面8.方面1-7中任一项的方法,其中所述施用导致血清胰岛素水平在正常范围内。

[0138] 方面9.方面1-7中任一项的方法,其中所述施用导致血糖水平在正常范围内。

[0139] 方面10.方面1-9中任一项的方法,另外包括施用至少一种另外的治疗性药剂。

[0140] 方面11.方面10的方法,其中至少一种另外的治疗性药剂为胰岛素、胰岛素类似物、双胍类或噻唑烷二酮类。

[0141] 方面12.方法1-11中任一项的方法,其中所述施用是经口施用。

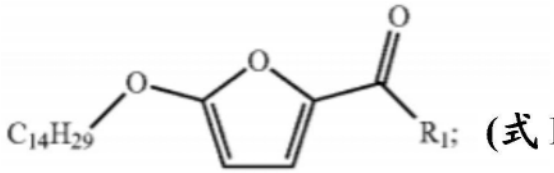
[0142] 方面13.方面1-12中任一项的方法,其中式I化合物为每日施用。

[0143] 方面14.方面1-12中任一项的方法,其中式I化合物为每周施用一次。

[0144] 方面15.方面1-12中任一项的方法,其中式I化合物为通过受控递送施用。

[0145] 方面16.方面15的方法,其中式I化合物存在于可植入递送装置中。

[0146] 方面17.在个体中治疗代谢综合征的方法,该方法包括对个体施用有效量的式I化合物:

[0147] 

**(式 I)**

[0148] 其中:$R^1$为—O—$R^2$、—O—$R^3$—O$R^2$、—O—$R^3$—OC(O)—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^5$)$R^6$、—O—$R^3$—N($R^4$)C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)O$R^5$、—O—$R^3$—C(O)N($R^5$)$R^6$或—N($R^5$)S(O)$_2$—$R^4$;

[0149] 每个$R^2$独立地为烷基、卤代烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^3$独立地为任选地被取代的亚烷基链;$R^4$为任选地被取代的烷基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的杂芳基或任选地被取代的杂芳基烷基;每个$R^5$独立地为氢、烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的芳烷基;每个$R^6$为烷基、任选地被取代的环烷基、任选地被取代的芳烷基或—$R^3$—C(O)O$R^4$;或任何$R^5$和$R^6$连同它们二者所连接的氮形成任选地被取代的N-杂环基或任选

地被取代的N-杂芳基;该式I化合物为单个的立体异构体或为其混合物或其药学上可接受的盐的形式。

[0150] 方面18.方面17的方法,其中该化合物为5-(十四烷氧基)-2-糠酸。

[0151] 方面19.方面17或方面18的方法,其中所述施用为经口施用。

[0152] 方面20.方面17-19中任一项的方法,其中所述式I化合物为每日施用。

[0153] 方面21.方面17-19中任一项的方法,其中所述式I化合物为每周施用一次。

[0154] 方面22.方面17-19中任一项的方法,其中所述式I化合物为通过受控递送施用。

[0155] 方面23.方面22的方法,其中式I化合物存在于可植入递送装置中。

[0156] 实施例

[0157] 提出以下实施例以便为本领域的普通技术人员提供完整的公开和描述如何制造和使用本发明,并且并非旨在限制发明人认为其发明的范围,也并非是他们旨在表示以下实验是所有或仅有进行的实验。已努力确保关于所使用的数字(例如量、温度等)的准确性,但应考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是按重量计的份数,分子量是重量平均分子量,温度是以摄氏度计,压力处于或接近大气压。可以使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下;等。

[0158] 实施例1:小鼠中的TOFA在胆碱缺乏的高脂肪饮食(CDAHFD)诱导的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)进展中的剂量依赖效应

[0159] 方法

[0160] 用60kcal%脂肪、0.1%蛋氨酸且不添加胆碱的L-氨基酸饮食(Research Diets A06071302i)喂养六周龄C57BL/6雄性小鼠三周,然后引入溶媒(对照)或TOFA通过灌胃持续另外三周(图1a)。每日两次用改变剂量的TOFA(0、25、50、125或250mg/kg/天)对小鼠灌胃。在六周研究终止后,收集血清和肝脏样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam105134和abcam105135)测量血清肝损伤生物标志物,丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)。由商业上可得的试剂盒(abcam65336)由肝脏样品中检测肝甘油三酯。基于肝脏样品的苏木精和伊红(H&E)染色,还就肝脂肪变性程度对肝脏样品评分。

[0161] 结果

[0162] 用TOFA经口治疗的小鼠显示在血清ALT和AST活性水平方面的剂量依赖降低(图1B)。类似地,肝脏中的脂质水平基于TOFA浓度以剂量依赖方式下降,通过每克肝脏的肝脏甘油三酯含量定量显示(图1C,左)。与TOFA剂量增加相关的肝脂肪变性程度降低的观察结果支持了这一点(图1C,右)。这些发现表明TOFA耐受良好并且明确降低了肝脏中的脂质积聚。

[0163] 图1A-1C阐明了TOFA治疗在患有CDAHFD诱导的NAFLD进展的小鼠中的剂量依赖效应。图1A显示了实验时间进程。用CDAHFD喂养小鼠3周,然后用不同浓度的TOFA经口治疗3周。图1B是阐明肝损伤生物标志物的活性水平的图,左侧是丙氨酸转氨酶(ALT),右侧是天冬氨酸转氨酶(AST)。图1C是通过肝脏甘油三酯的定量测量(左侧)和来自苏木精和伊红(H&E)染色的肝脏切片的肝脂肪变性的评分评估(右侧)阐明肝脏脂质状态的图。将Brown-Forsythe和Welch单因素ANOVA统计检验用于确定统计显著性。

[0164] 实施例2.TOFA在小鼠中在60%kcal脂肪饮食诱导的早期肝脂肪变性及相关代谢

障碍的挽救效果。

[0165] 方法

[0166] 用60kcal％脂肪饮食(Research Diets A12492i)喂养六周龄的C57BL/6雄性小鼠七周,然后引入溶媒(对照)或250mg/kg TOFA初始负荷剂量,通过每天两次灌胃一周(图2A)。然后每天用溶媒(对照)或125mg/kg TOFA维持剂量通过每天两次灌胃治疗小鼠持续另外三周。在整个时间进程期间跟踪小鼠体重。在治疗三周后,进行腹膜内葡萄糖耐量试验(IP-GTT)和胰岛素耐量试验(IP-ITT)。在这些试验之前,小鼠空腹6小时,然后用1g/kg D-葡萄糖或0.75U/kg HumulinR(Eli Lilly)挑战(challenge),并且监测血糖水平2小时(Bayer Contour Next)。通过尾静脉收集静脉空腹血,并且用于通过商业上可得的ELISA试剂盒(CrystalChem90080)测量空腹胰岛素水平。在收获前,小鼠经历了全身成分分析(EchoMRI™2012)。在11周研究终止后,收集血清和肝脏样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam105134和abcam105135)测量血清肝损伤生物标志物,ALT和AST。由商业上可得的试剂盒(abcam65336)测量肝和血清甘油三酯水平。

[0167] 结果

[0168] 与溶媒对照治疗的小鼠相比,用TOFA治疗后,小鼠表现出重量损失,显示出TOFA作为减重和减脂剂的效力,没有影响食物摄入(图2B、图2C)。通过在TOFA治疗的小鼠中,相对于全身体重,脂肪质量的显著减少和瘦质量(lean mass)的增加支持了这一点(图2D)。IP-GTT显示,随时间推移,TOFA治疗的小鼠通过改善的葡萄糖清除而更加葡萄糖耐受(图2E)。此外,TOFA治疗的小鼠在空腹血糖水平方面具有大的改善,以及空腹胰岛素水平显著降低(图2E、2F)。IP-ITT强调了由于TOFA治疗小鼠,通过葡萄糖清除反应改善的胰岛素敏感性(图2G)。虽然不受理论束缚,但通过肝脏中导致NAFLD病理和进展(例如,胰岛素抵抗)的异位脂质的减少,TOFA对ACC活性的抑制和随后的脂肪酸合成减少可以有助于血糖稳态中这些代谢参数的改善。血清分析揭示了血清ALT和AST生物标志物没有显著变化(图2H)。这可以解释来自高脂肪饮食的饮食诱导损伤的时间进程缩短。相对于其他饮食诱导的NAFLD时间线和饮食,该饮食时间进程最接近模拟与NAFLD进展密切相关的早期代谢失调(例如,肥胖症并发症、糖尿病、代谢综合征)。然而,TOFA治疗显著降低了肝和血清二者的甘油三酯水平(图2I)。如推测的那样,体内脂质循环的总体降低可以有助于整体改善的代谢稳态。因此,这些结果显示TOFA是通过降低体内脂质负荷来减少早期NAFLD相关代谢失调的有效药剂。

[0169] 图2A-2I阐明了TOFA治疗对60％kcal脂肪饮食诱导的代谢综合征和早期NAFLD进展的效果。图2A显示了实验时间线。用60％kcal脂肪饮食喂养小鼠七周,然后TOFA经口治疗(一周的250mg/kg负荷剂量,然后三周的125mg/kg维持剂量,每日经两个剂量),持续四周。代谢谱在治疗的最后一周开始。图2B是跟踪实验时间进程内重量变化的图。图2C是跟踪实验时间进程内60％kcal脂肪饮食累积摄入的图。图2D是阐明相对于体重,通过EchoMRI测量的脂肪和瘦质量变化的图。

[0170] 图2E是阐明腹膜内葡萄糖挑战(IP-GTT)期间血糖水平随时间推移的图(左侧)。曲线表示下的面积显示在右侧。图2F是阐明空腹血清胰岛素水平的图。图2G是阐明腹膜内胰岛素挑战(IP-ITT)期间血糖水平随时间推移的图(左侧)。曲线表示下的面积显示在右侧。图2H是阐明肝损伤生物标志物的活性水平的图,左侧是丙氨酸转氨酶(ALT),右侧是天冬氨

酸转氨酶(AST)。图2I是通过肝脏甘油三酯的定量测量(左侧)和血清脂质水平的定量测量(右侧)阐明体脂状态的图。

[0171] 实施例3.TOFA在小鼠中在CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH进展中的挽救效果。

[0172] 方法

[0173] 用具有60kcal％脂肪、0.1％蛋氨酸且不添加胆碱的L-氨基酸饮食(Research Diets A06071302i)喂养六周龄C57BL/6雄性小鼠八周,然后每天引入溶媒(对照)或250mg/kg TOFA通过每天两次受控的灌胃持续另外四周(图3A)。在12周研究终止后,收集血清和肝脏样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam105134和abcam105135)测量血清肝损伤生物标志物,ALT和AST。由商业上可得的试剂盒(abcam65336)测量肝和血清甘油三酯水平。将肝脏样品固定在4％多聚甲醛中并包埋在石蜡块中用于切片,然后用苏木精和伊红(H&E)或天狼猩红(Picrosirius Red)染色,染料背景为固绿。将冷冻的新鲜肝脏组织包埋在OCT中,切片,并且随后用油红O染色。

[0174] 结果

[0175] 用TOFA治疗的小鼠显示血清ALT活性水平显著降低和血清AST水平的平均降低(图3B)。此外,TOFA治疗降低了肝脏甘油三酯含量,血清甘油三酯水平没有增加(图3c)。在TOFA治疗的小鼠中的组织病理学评价呈现出肝脂肪变性程度降低,以及其他疾病病理标志物如炎症、气球样变和纤维化的减少,如在Kleiner等人(2005)中概述的度量标准评分(图2D、图2E)。组织学染色揭示了TOFA治疗通过油红O呈现脂质含量降低,通过H&E呈现细胞质液泡化减少,并且通过天狼猩红染色呈现纤维化减少(图2F)。总体而言,这些结果表明TOFA在改善晚期NAFLD进展和NASH病理中有效,同时最小化先前报道的用其他ACC抑制剂的潜在不良代谢反应,如血清甘油三酯水平升高。

[0176] 图3A-3F显示了TOFA治疗在小鼠中在CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH进展中的挽救作用。图3A显示了实验时间线。用CDAHFD喂养小鼠八周,然后TOFA经口治疗(每日250mg/kg,分两个剂量)持续四周。图3B是阐明肝损伤标志物的活性水平的图,左侧是丙氨酸转氨酶(ALT),右侧是天冬氨酸转氨酶(AST)。图3C是通过肝脏甘油三酯的定量测量(左侧)和血清脂质水平的定量测量(右侧)阐明体脂状态的图。图3D是阐明来自苏木精和伊红(H&E)染色的肝脏切片的肝脂肪变性的评分评估的图。图3E是阐明来自苏木精和伊红及天狼猩红(Sirius red)染色的肝脏切片的肝炎症、肝细胞气球样变和纤维化的组织病理学评分评估的图。图3F是显示油红O、苏木精和伊红以及天狼猩红染色的肝脏切片的小图(panel)。比例尺为50μm。使用学生非配对t检验确定统计学显著性。

[0177] 实施例4.来自用溶媒或TOFA治疗的CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH小鼠的肝脏样品的全基因组RNA测序

[0178] 方法

[0179] 从实施例3中的小鼠(见上文)中收集肝脏样品。从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒),构建cDNA文库(Roche KAPA HyperPrep试剂盒),在NovaSeq6000平台(Novogene)上测序,并进行下游分析流程。差异表达基因(DEGs)由至少一个log2倍变化(线性尺度中的2倍)定义,FDR截断值为0.05。为了验证,根据制造商的方案,使用总RNA制备cDNA(BioRAD iScript™逆转录),并在QuantStudio6系统(Applied Biosystems)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher)进行定量聚合酶链式反应(qPCR)。使用抗极低密度脂蛋白

受体(VLDLR)抗体(AF2258,1:2000)和抗β-微管蛋白抗体(CST2146,1:1000)通过蛋白质印迹测量蛋白质表达水平。使用辣根过氧化物酶(HRP)二抗(1:5000)将膜显影,并使用增强型化学发光HRP底物(Thermo34577)可视化。

[0180] 结果

[0181] 有趣的是,肝脏样品的RNA测序分析揭示了TOFA在影响过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR)核激素受体超家族(特别是PPAR-α)的转录活性的潜在作用。TOFA治疗中观察到的若干最高上调基因是标准的PPAR-α靶基因(图4A)。PPAR信号通路(来自2021KEGG人类数据库)的特定分析显示了TOFA治疗上调了PPAR转录控制下的各种基因(图4B)。通过在过程如氧化磷酸化、脂肪酸代谢和过氧化物酶体中显著上调的基因的各种GSEA热图进一步证实了这一观察结果,所有这些都是与PPAR信号通路的作用密切相关的过程(图4C)。还观察到TOFA治疗与炎症反应的负相关,支持TOFA治疗在降低NAFLD病理的炎症标志物方面的安全性和效力(图4C,右下)。在由TOFA治疗上调的基因中,在极低密度脂蛋白受体(VLDLR)基因、PPAR-α靶基因的表达方面存在显著增加(图4D)。这种增加在mRNA表达水平中被转化为在TOFA治疗的肝脏样品中VLDLR的蛋白质表达水平的增加(图4E)。先前的研究已经证实了通过PPAR-α激动剂(例如非诺贝特)上调VLDLR以介导降低甘油三酯效果的作用。该初步数据连接了VLDLR上调的TOFA作用与PPAR-α激动剂作用的潜在关系,由非诺贝特-PPAR-α-VLDLR信号轴,以诱导甘油三酯降低效果。因此,不受理论束缚,TOFA或衍生物用于治疗脂肪性肝病及其相关的代谢失调可以通过ACC抑制和PPAR激动,利用多方面的多重药理学方法。

[0182] 图4A-4E显示了来自用TOFA治疗的由CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH小鼠的肝脏样品的RNA测序结果。图4A是差异上调和下调基因的火山图。差异基因处于FDR截断值为0.05且变化截断值为2倍。图4B是阐明PPAR信号通路中上调和下调的基因的热图,取自KEGG_2021_人类数据库。列代表样品,行代表基因。颜色表明相对于所有样品的平均表达的基因表达水平(log2 RPKM)。图4C是富集于若干标志性基因集的差异调控基因的GSEA图:氧化磷酸化(左上)、脂肪酸代谢(右上)、过氧化物酶体(左下)和炎症反应(右下)。显示了每个标志的标准化富集分数(NES)和错误发现率(FDR)。图4D是阐明小鼠肝脏VLDLR mRNA表达相对于r18S mRNA表达的图。图4E是小鼠肝脏样品中VLDLR和β-微管蛋白表达水平的蛋白质印迹图像。使用学生未配对t检验确定统计显著性。

[0183] 实施例5.TOFA在小鼠中的耐受性和毒性

[0184] 方法

[0185] 用PicoLab啮齿动物饮食(Purina 5053)或标准饮食、自由进食喂养十一周龄C57BL/6J雄性小鼠,同时用对照或125mg/kg,每日两次(BID)通过灌胃治疗,持续3周。在整个时间进程期间跟踪小鼠体重。研究终止后,收集血清和肝脏样本。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam83362和Cayman700460)评估血清生物标志物如血尿素氮(BUN)和肌酐。此外,通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam65336和abcam65390)测量肝和血清甘油三酯和胆固醇水平。

[0186] 结果

[0187] 治疗进程内,用TOFA治疗的小鼠中没有观察到重量变化,并且在TOFA治疗与溶媒治疗的小鼠之间没有重量差异(图5A)。血清生物标志物如BUN(图5B)和肌酐(图5C)分析表明没有药物诱导的肾损伤。观察到肝脏甘油三酯水平降低(图5D),这是这类代谢调节剂的

特征。此外,血清甘油三酯水平没有显著变化(图5E),这是靶向相同酶(ACC1/2)的其他小分子中的独特观察结果。观察到肝脏(图5F)或血清(图5G)中胆固醇水平没有变化。这些发现表明TOFA是经口生物可利用的,适合用于每日两次或不太频繁的给药方案,并且在小鼠中耐受良好。

[0188] 图5A-5B阐明了TOFA治疗在自由进食饲料小鼠中的安全性和耐受性特性。图5A是实验时间进程内跟踪重量变化的图。图5B是阐明血清中血尿素氮(BUN)水平的图。图5C是阐明血清中肌酐水平的图。图5D是阐明肝脏甘油三酯的定量测量的图。图5E是阐明血清甘油三酯的定量测量的图。图5F是阐明肝脏胆固醇的定量测量的图。图5G是阐明血清总胆固醇的定量测量的图。使用学生未配对的t检验确定统计显著性。

[0189] 实施例6.TOFA在饮食诱导的肥胖症(DIO)的60% HFD小鼠模型中的剂量依赖效应

[0190] 方法

[0191] 用60kcal%脂肪饮食(Research Diets A12492i)喂养六周龄C57BL/6J雄性小鼠十周,然后引入溶媒(对照)或TOFA,以改变剂量持续另外两周。以12.5、25、62.5或125mg/kg剂量,每日两次,经口施用TOFA。在治疗时间进程期间监测小鼠重量和食物摄入。在收获前,小鼠经历了全身成分分析(EchoMRI™2012)。在12周研究终止后,收集血清和肝脏样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam65336和abcam65390)测量肝和血清甘油三酯和胆固醇水平。将另外的肝脏样品固定在4%多聚甲醛中并包埋在石蜡块中用于切片,并且随后用苏木精和伊红(H&E)染色。

[0192] 结果

[0193] 用TOFA治疗后,小鼠在最高剂量(125mg/kg,每日两次)表现出重量损失,证实了有效的剂量(图6A)。与溶媒对照治疗的小鼠相比,以较低浓度给药导致较小或可忽略不计的体重变化(图6B)。在治疗组之间的体重变化并不是归因于治疗期间的食物摄入变化,该食物摄入在整个时间进程中保持恒定(图6C)。身体组成分析揭示了,在最高剂量治疗组中脂肪质量占体重的百分比减少,而在所有治疗组之间整体瘦质量没有变化,将重量变化归因于脂肪质量的减少(图6D)。肝脏甘油三酯的分析另外支持体内脂质水平变化的概念,在最高剂量治疗方案中,肝脏甘油三酯水平显著降低(图6E)。最突出地,在血清甘油三酯水平(图6F)和血清胆固醇水平,特别是HDL和VLDL/LDL部分这二者(图6G),存在剂量依赖降低。肝切片的组织学分析揭示了肝脂肪变性以剂量依赖的方式改善,并提供了125mg/kg,每日两次作为最有效的给药方案的另外的支持(图6H)。总体而言,这些结果显示TOFA以剂量依赖的方式起作用,以应对代谢综合征的多种特征,并另外支持在代谢综合征的小鼠饮食诱导的模型中TOFA治疗所带来的代谢益处(参见实施例2)。

[0194] 图6A-6H阐明了TOFA治疗在患有60%HFD饮食模型饮食诱导的肥胖症小鼠中的剂量依赖效应。图6A是治疗时间进程中跟踪重量变化的图。图6B是阐明从治疗时间进程的开始至结束的总百分比体重变化的图。图6C是阐明实验时间进程内60%kcal脂肪饮食的食物摄入的图。

[0195] 图6D是阐明脂肪和瘦质量相对于体重的变化的图,通过EchoMRI测量。图6E是阐明肝脏甘油三酯的定量测量的图。图6F是阐明血清甘油三酯的定量测量的图。图6G是阐明HDL胆固醇、VLDL/LDL胆固醇和血清总胆固醇的定量测量的图。图6H是显示在10x放大倍数下肝脏切片的苏木精和伊红染色的代表性图像的小图。使用Brown-Forsythe和Welch单因素

ANOVA统计检验来确定统计显著性。

[0196] 实施例7.来自饮食诱导的肥胖症和相关代谢障碍的60％HFD小鼠模型的肝脏样品的转录分析

[0197] 方法

[0198] 用60kcal％脂肪饮食(Research Diets A12492i)喂养六周龄C57BL/6J雄性小鼠七周,然后引入对照或125mg/kg,每日两次,TOFA初始负荷剂量,每日通过受控的灌胃,持续一周(图2A)。然后用溶媒或62.5mg/kg,每日两次,TOFA维持剂量,每日通过灌胃治疗小鼠持续另外三周。在11周研究终止后,收集肝脏样品。从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒74106),构建cDNA文库(Roche KAPA HyperPrep试剂盒),在NovaSeq6000平台(Novogene)上测序,并进行下游分析流程。差异表达基因(DEG)由至少一个log2倍变化(线性尺度中的2倍)定义,FDR截断值为0.05。为了验证,根据制造商的方案使用总RNA制备cDNA(BioRAD iScript™逆转录),并在QuantStudio6系统(Applied Biosystems)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher A25742)进行qPCR。

[0199] 结果

[0200] 为了支持实施例4的结果,肝脏样品的RNA测序分析揭示了TOFA在影响过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号网络的转录活性的潜在作用,这一观察结果在不同的饮食诱导的严重代谢疾病模型中一致。用TOFA治疗看到的若干最高上调基因是标准的PPAR-α靶基因,以及被PPAR-α激活负调控的显著下调的基因(图7A)。来自TRRUST转录因子2019参考数据库的上调基因的转录调控关系分析揭示,PPARA是TOFA治疗后的转录调控中的主要作用因子之一(图7B)。来自BioPlanet2019数据库对PPAR信号通路中的基因的具体分析进一步支持了这一观察结果,该分析强调TOFA治疗在PPAR转录控制下上调各种基因(图7C)。来自RNA测序分析被鉴别为下游PPAR靶点的各种基因通过逆转录-qPCR(RT-qPCR)被证实为从TOFA治疗被上调,并参与脂质稳态的各种过程,如脂肪酸β氧化、酰基辅酶A加工以及脂蛋白摄入和代谢(图7D)。无论饮食挑战小鼠模型和代谢疾病严重程度的阶段,这些结果支持TOFA的相似转录活性特征。

[0201] 图7A-7D显示了在来自TOFA治疗的60％ HFD饮食诱导的肥胖症小鼠模型的肝脏中基因变化的转录分析。图7A是差异上调和下调基因的火山图。差异基因处于FDR截断值为0.05且变化截断值为2倍。图7B是显示来自TRRUST转录因子2019参考数据库的上调基因库中一些最显著上调的转录因子特征的p值的条形表。图7C是阐明PPAR信号通路中上调和下调的基因的热图,取自BioPlanet 2019数据库。列代表样品,行代表基因。颜色表明相对于所有样品的平均表达的基因表达水平(log2 RPKM)。图7D是阐明相对于r18s mRNA的表达,按功能共性分组、具有PPAR转录调控的选定基因的小鼠肝脏mRNA水平的表达的图。使用学生未配对t检验确定统计显著性。

[0202] 实施例8.TOFA在小鼠中在CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH进展中的挽救效果的深入研究

[0203] 方法

[0204] 用具有60kcal％脂肪、0.1％蛋氨酸且不添加胆碱的L-氨基酸饮食(CDAHFD;Research Diets A06071302i)喂养六周龄C57BL/6J雄性小鼠八周。十名受试者被随机分配至溶媒(对照)治疗或125mg/kg,每日两次,TOFA治疗,通过灌胃递送,持续另外四周。在整个

治疗时间进程期间,监测小鼠重量。在12周研究终止后,收集血清和肝脏样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam105134和abcam105135)测量血清肝损伤生物标志物,ALT和AST。通过商业上可得的试剂盒(abcam65336)测量肝和血清甘油三酯水平。根据制造商的方案,从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒74106),并且制备cDNA(BioRAD iScript™逆转录)。在QuantStudio6系统(Applied Biosystems)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher A25742)进行定量PCR(qPCR)。

[0205] 结果

[0206] 从治疗开始后约10天开始观察到体重的显著差异,并且该差异变得更加显著,直至研究终止(图8A)。与溶媒对照治疗的小鼠相比,在体重方面,TOFA治疗的小鼠具有显著降低(图8B)。对于肝损伤的血清生物标志物的分析显示ALT(图8D)和AST(图8D)趋势性下降。此外,在TOFA治疗的小鼠中,存在肝脏甘油三酯水平显著降低(图8D)以及存在肝过氧化氢水平降低,表明活性氧(ROS)物质减少(图8F)。肝脏分析物的分析支持在NAFLD/NASH的饮食诱导的模型中通过TOFA治疗改善肝脏健康的概念。通过RT-qPCR评估炎症基因,如Il1b和Tnfa,作为炎症的生物标志物。结果显示这些炎症相关基因的表达降低(图8G)。此外,如通过qPCR所评估的,参与胶原蛋白生物合成的基因表达降低,表明纤维化减少(图8H)。如实施例4和实施例7中所见,来自PPAR信号网络的转录活性可以有助于TOFA的治疗效果。具有PPAR调节元件的选定基因的RT-qPCR分析揭示了若干参与各种过程,如β氧化和脂肪生成,用TOFA治疗上调的基因(图8I)。这些结果全部支持并另外提供了TOFA在应对NAFLD/NASH的多个方面如代谢失调、炎症和纤维化的作用的先前观察的结果(实施例3和实施例4)的证据。

[0207] 图8A-8I显示了TOFA治疗效力在NAFLD/NASH的CDAHFD饮食诱导的小鼠模型中的深入分析。图8A是跟踪治疗时间进程内重量变化的图。图8B是阐明介于治疗时间段的开始与结束之间的总百分比体重变化的图。图8C是阐明血清丙氨酸转氨酶(ALT)活性水平的图。图8D是阐明血清天冬氨酸转氨酶(AST)活性水平的图。图8E是阐明肝脏甘油三酯的定量测量的图。图8F是阐明肝过氧化氢的定量测量的图。图8G是阐明相对于r18s mRNA的表达,与炎症相关的小鼠肝脏mRNA的表达水平的图。

[0208] 实施例9.在一项基准研究中,TOFA的效力与使用CDAHFD诱导的晚期NAFLD/NASH小鼠模型中用于NASH的领先的临床候选药物相当。

[0209] 方法

[0210] 用具有60kcal%脂肪、0.1%蛋氨酸且不添加胆碱的L-氨基酸饮食(CDAHFD;Research Diets A06071302i)喂养六周龄C57BL/6J雄性小鼠八周。小鼠被随机分配至溶媒(对照)、250mg/kg TOFA、5mg/kg Firsocostat(Gilead Sciences)、50mg/kg非诺贝特、或5mg/kg Firsocostat和50mg/kg非诺贝特的组合剂量的治疗组。所有治疗均每天一次(QD)通过灌胃递送,持续另外四周。在治疗时间进程期间监测小鼠重量和食物摄入。在12周研究终止后,收集肝脏和血清样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam105134和abcam105135)测量血清肝损伤生物标志物,ALT和AST。由商业上可得的试剂盒(abcam65336)测量肝和血清甘油三酯水平。根据制造商的方案,从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒74106),并且制备cDNA(BioRAD iScript™逆转录)。在QuantStudio6系统(Applied Biosciences)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher A25742)进行定量

PCR(qPCR)。使用抗VLDLR抗体(AF2258,1:2000)、抗CPT1A抗体(CST12252,1:1000)和抗组蛋白H3抗体(CST9715,1:1000),通过蛋白质印迹测量肝脏样品的蛋白质表达水平。使用HRP二抗(1:5000)将膜显影,并使用增强型化学发光HRP底物(Thermo34577)可视化。将另外的肝脏样品固定在4%多聚甲醛中并包埋在石蜡块中用于切片,并且随后用苏木精和伊红(H&E)染色。

[0211] 结果

[0212] 为了评估TOFA与相同分子靶向类别的其他临床候选药物相比的效果,用溶媒对照、TOFA、Firsocostat(ACC1/2抑制剂,Gilead Sciences)、非诺贝特(PPAR-α激动剂)、或Firsocostat和非诺贝特的组合的最佳剂量治疗饮食诱导的NAFLD/NASH小鼠。在所有治疗方案中,与溶媒对照治疗的小鼠相比,TOFA治疗的小鼠证实了显著的重量损失,而所有其他治疗方案具有相当的体重变化(图9A、图9B)。体重变化并不是归因于食物摄入变化(图9C)。肝损伤生物标志物,如ALT(图9D)和AST(图9E)的血清分析,揭示了TOFA治疗导致与Firsocostat单独和组合治疗的ALT和AST降低的相似水平。最突出地,相对于Firsocostat治疗和溶媒对照治疗,TOFA治疗具有肝脏甘油三酯水平的强降低(图9F)。相对于溶媒对照治疗,TOFA治疗以与Firsocostat、非诺贝特或两种药剂的组合相当或更强的程度大幅减轻了肝损伤。RT-qPCR分析另外显示出相对于其他治疗方案,TOFA治疗的特定的、相当的反应,如参与炎症(例如,Il1b和Il6)和胶原蛋白合成(例如,Col1a1和Col3a)的基因(图9G)。此外,TOFA治疗诱导了PPARA下游靶点,如Vldlr和Cpt1a的独特增加,这在用其他治疗方案中未观察到(图9G)。蛋白质表达水平的蛋白质印迹分析支持RT-qPCR观察结果,如TOFA治疗以比其他治疗方案更高的程度增加VLDLR和CPT1A的蛋白质表达水平(图9H)。通过H&E染色组织学分析进一步支持了我们的观察结果,即,TOFA治疗组的脂肪变性水平相对于对照降低,并且与其他治疗方案相比,改善水平相当(图9I)。综上所述,这些结果是在有效、单一方案给药中TOFA的用途与在饮食诱导的NAFLD/NASH的CDAHFD小鼠模型中领先的临床候选药物具有相当的效力的证据。

[0213] 实施例10.TOFA证实与其他代谢调节治疗剂,如GLP1受体激动剂作为组合药剂的效力

[0214] 方法

[0215] 用具有60kcal%脂肪、0.1%蛋氨酸且不添加胆碱的L-氨基酸饮食(CDAHFD;Research Diets A06071302i)喂养六周龄C57BL/6J雄性小鼠八周。小鼠被随机分配至溶媒(对照)、250mg/kg TOFA、5nmol/kg司美格鲁肽(Novo Nordisk)、或250mg/kg TOFA加5nmol/kg司美格鲁肽的组合剂量的治疗组。TOFA通过灌胃施用。司美格鲁肽给药在治疗方案开始是向上增加剂量(up-titrated),并在后肩/颈部侧面处通过皮下注射递送。所有治疗每日一次递送,持续另外四周。在治疗时间进程期间监测小鼠重量和食物摄入。在12周研究终止后,收集肝脏和血清样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam105134和Cayman701640)测量血清肝损伤生物标志物,ALT和AST。使用商业上可得的试剂盒(abcam65336)测量肝和血清甘油三酯水平。根据制造商的方案,从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒74106),并且制备cDNA(BioRAD iScript™逆转录)。在QuantStudio6系统(Applied Biosciences)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher A25742)进行定量PCR(qPCR)。从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒74106),并根据制造商的方案制备cDNA(BioRAD

iScriptTM逆转录)。在QuantStudio6系统(Applied Biosciences)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher A25742)进行定量PCR(qPCR)。将另外的肝脏样品固定在4％多聚甲醛中并包埋在石蜡块中用于切片,并且随后用苏木精和伊红(H&E)或天狼猩红染色(固绿染料背景)。

[0216] 结果

[0217] 由于与其他代谢调节剂,如GLP-1受体激动剂相比,TOFA表现出独特的作用机制,TOFA被用作与司美格鲁肽(Novo Nordisk)的组合药剂,以测试在饮食诱导的NAFLD/NASH的CDAHFD小鼠模型中的效力。治疗开始后,单个治疗组和与司美格鲁肽的组合治疗组立即经历了重量损失,与司美格鲁肽作为重量损失调节剂的先前观察结果一致(图10A)。在治疗时间进程结束时,揭示了与司美格鲁肽治疗的小鼠相比,TOFA治疗的小鼠经历了较小程度的重量损失,但相对于单个药剂治疗组和溶媒对照治疗组,组合治疗(TOFA和司美格鲁肽)的小鼠经历了较大的重量损失(图10B)。体重变化不是由于在治疗时间过程期间食物摄入的变化(图10C)。肝脏样品的RT-qPCR分析揭示了TOFA在应对炎症的特异性反应,这在单独的司美格鲁肽治疗的小鼠中未观察到(图10D)。通过RT-qPCR对参与胶原蛋白生物合成的基因的分析显示了TOFA和司美格鲁肽二者在降低mRNA水平中的强抑制效果,而组合治疗显示mRNA表达水平趋势性进一步降低(图10D)。肝脏甘油三酯分析揭示,相对于溶媒对照治疗,司美格鲁肽治疗的小鼠具有肝脏甘油三酯水平的趋势性下降,而TOFA治疗的小鼠具有较强、显著的肝脏甘油三酯水平降低(图10E)。组合治疗具有最大的整体肝甘油三酯水平的降低(图10E)。血清ALT分析显示,来自单一药剂治疗方案和组合治疗的ALT水平相似的中度降低趋势(图10F)。单个药剂TOFA治疗是仅有的具有证实的血清AST水平降低的组,这可以归因于可以有助于血清AST水平的AST的非肝特异性表达,如肾脏、心脏和骨骼肌(图10G)。血清生物标志物分析进一步支持TOFA用作减少肝损伤的有效治疗剂,如从肝损伤生物标志物中读出的那样。相对于对照,与单独的TOFA治疗的肝脏切片脂肪变性较大的减少相比,单独的司美格鲁肽治疗呈现脂肪变性中度减少,通过H&E的组织学分析显示与其中所观察到的相似的趋势,并且脂肪变性减少最大(图10H)。类似地,在用于纤维化含量的天狼猩红染色中注意到前述提及的组织学趋势(图10I)。总而言之,TOFA代表了潜在的候选药物,作为与具有正交靶点和机制的临床先导药物的组合药剂。基于初步观察结果,司美格鲁肽-TOFA组合结果强调了TOFA用于组合的耐受性,没有观察到药物-药物拮抗剂效果,以及组合在应对单独的司美格鲁肽治疗效力的缺点的改善,如代谢和炎症方面。

[0218] 实施例11.TOFA具有与同类其他小分子相比不可预期的作用,如互补和广泛的功能性,包括PPARA的激活

[0219] 方法

[0220] 用具有60kcal％脂肪、0.1％蛋氨酸且不添加胆碱的L-氨基酸饮食(CDAHFD;Research Diets A06071302i)喂养六周龄遗传性PPARA敲除(PPARA KO)雄性小鼠三周,或者用60kcal％脂肪饮食(DIO;Research Diets A12492i)喂养八周,然后引入溶媒(对照)或125mg/kg TOFA,每日两次,通过灌胃,持续另外两周(分别为图11A和图11J)。用CDAHFD喂养C57BL/6J(WT)小鼠并使其经历相似的实验病症和时间进程。在治疗时间过程期间监测小鼠重量和不良事件。研究终止后,收集血清和肝脏样品。通过商业上可得的试剂盒(分别为abcam105134和abcam105135)测量血清肝损伤生物标志物,ALT和AST。由商业上可得的试剂

盒(abcam65336)测量肝和血清甘油三酯水平。根据制造商的方案,从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒74106),并且制备cDNA(BioRAD iScript™逆转录)。在QuantStudio6系统(Applied Biosciences)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher A25742)进行定量PCR(qPCR)。从肝脏组织中提取总RNA(Qiagen RNeasy试剂盒74106),并根据制造商的协议制备cDNA(BioRAD iScriptTM逆转录)。在QuantStudio6系统(Applied Biosciences)上用快速SYBR Green Mix(ThermoFisher A25742)进行定量PCR(qPCR)。使用抗ACC1/2抗体(CST3662,1:1000)、抗VLDLR抗体(AF2258,1:2000)、抗CPT1A抗体(CST12252,1:1000)、抗PPARA抗体(abcam126285,1:1000)和抗β-微管蛋白抗体(CST2146,1:1000),通过蛋白质印迹测量肝脏样品的蛋白质表达水平。使用HRP二抗(1:5000)将膜显影,并使用增强型化学发光HRP底物(Thermo34577)可视化。将另外的肝脏样品固定在4%多聚甲醛中并包埋在石蜡块中用于切片,并且随后用苏木精和伊红(H&E)染色。将冷冻的新鲜肝组织包埋在OCT中,切片,然后用油红O染色。

[0221] 结果

[0222] 在具有PPARA KO的CDAHFD饮食诱导的NAFLD/NASH小鼠模型中,整体TOFA治疗方案引起重量趋势性下降(图11B)。肝损伤血清生物标志物,如ALT和AST的分析揭示了ALT和AST水平边际降低(分别为图11E和图11D)。此外,肝脏甘油三酯分析显示肝脂质水平没有显著降低(图11E),与先前在野生型小鼠中的研究相反(图3C和图8E)。Cpt1a(参与脂肪酸β氧化的基因)的RT-qPCR分析揭示了诱导Cpt1amRNA对在野生型小鼠中的TOFA治疗是特异性的,并且通过TOFA治疗的这种上调反应在PPARA KO小鼠中减弱(图11F)。通过对选定蛋白质(如CPT1A、VLDLR和ACC1)的蛋白质表达水平的蛋白质印迹分析,所有这些蛋白质都是PPAR-α的直接转录靶点,这另外支持了这一观察结果。相对于每个溶媒对照治疗的对应小鼠,前述提及的蛋白质的蛋白质表达水平在TOFA治疗的野生型小鼠中增加,但在TOFA治疗的PPARA KO小鼠中未观察到这种反应(图11G)。通过H&E的组织学分析揭示了肝脂肪变性的最小降低(图11H)并且通过油红O揭示了脂质含量的最小变化(图11I)。这两个组织学观察结果明显不同于在野生型小鼠中用TOFA治疗的先前观察结果(图3F)。这些结果共同提供了TOFA对PPARA信号网络的独特机制依赖以介导其在饮食诱导的NAFLD/NASH模型中的有益效果的证据。在采用60% HFD的饮食诱导肥胖症(DIO)模型中,在PPARA KO小鼠中的TOFA治疗引起治疗开始后体重减少(图11K),并导致治疗进程中总体重变化的显著差异(图11L)。在两周的治疗期内,用TOFA治疗的PPARA KO小鼠中观察到了不良事件(图11M)。对照和TOFA治疗的PPARA KO小鼠的血清甘油三酯分析揭示了TOFA治疗的小鼠中血清脂质水平升高(图11N)。这些观察结果表明,鉴于PPARA用于降低血清甘油三酯水平的已知作用,TOFA对PPARA的机制依赖抵消这样的不良事件。已显示Vldlr(参与脂蛋白摄入并在PPARA转录控制下的基因)的RT-qPCR分析在TOFA治疗的PPARA KO小鼠中具有减弱的反应(图11O),鉴于Vldlr在TOFA治疗的HFD喂养的野生型小鼠中持续上调(图7i),这是不可预料的。对照治疗和TOFA治疗的PPARA KO小鼠的H&E染色的肝脏切片之间的组织学比较显示肝脂肪变性方面的最小变化,进一步支持了在不存在PPARA的情况下TOFA治疗的效果减弱的概念(图11P)。据我们所知,我们的结果显示了在应对在小鼠饮食诱导的疾病模型中的严重代谢疾病中,TOFA对PPARA信号的不可预料的机制依赖性的第一个经验证据。

[0223] 虽然本发明已经参照其具体实施方案进行了描述,但本领域技术人员应该理解,

在不偏离本发明的真正精神和范围的情况下,可以做出各种改变并且可以替代等效物。此外,可以做出许多修改,以使具体情况、材料、物质的组成、过程、过程步骤或步骤适应本发明的目标、精神和范围。所有这样的修改旨在在所附权利要求的范围内。


a
开始
收获
时间(周)
0
3
6
CDAHFD 喂养
溶媒或 Cpd X 灌胃

图1A

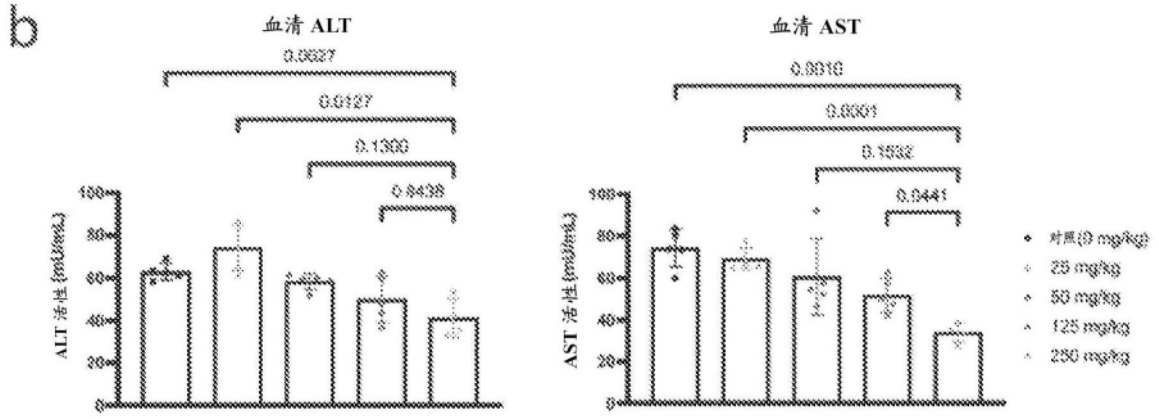

b
血清 ALT
0.0627
0.0127
0.1300
0.8438
ALT 活性 (mU/mL)
血清 AST
0.0016
0.0301
0.1532
0.0441
AST 活性 (mU/mL)
对照(0 mg/kg)
25 mg/kg
50 mg/kg
125 mg/kg
250 mg/kg

图1B

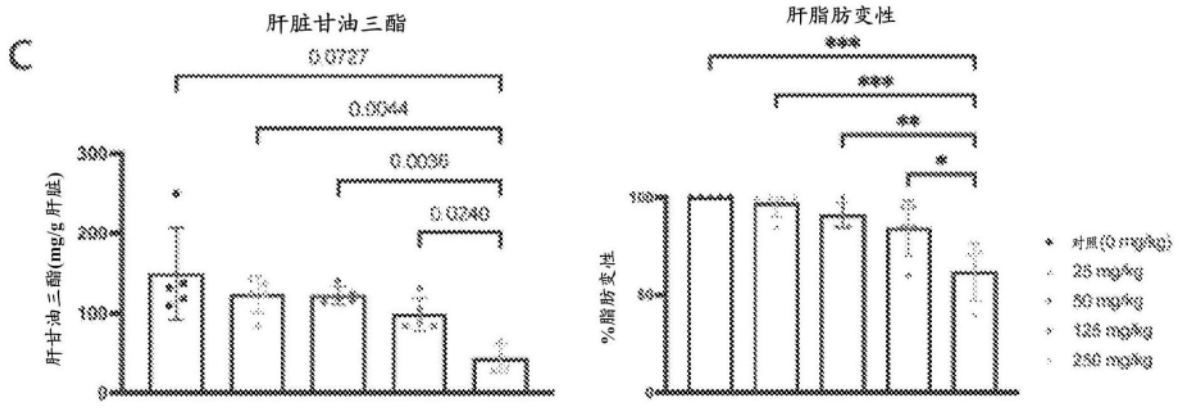

c
肝脏甘油三酯
0.0727
0.0044
0.0036
0.0240
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
肝脂肪变性
***
***
**
*
%脂肪变性
对照(0 mg/kg)
25 mg/kg
50 mg/kg
125 mg/kg
250 mg/kg

图1C


a
开始
代谢谱
收获
时间(周)
0
7
10
11
自由进食 60% HFD 饮食喂养
溶媒或
TOFA 灌胃

图2A

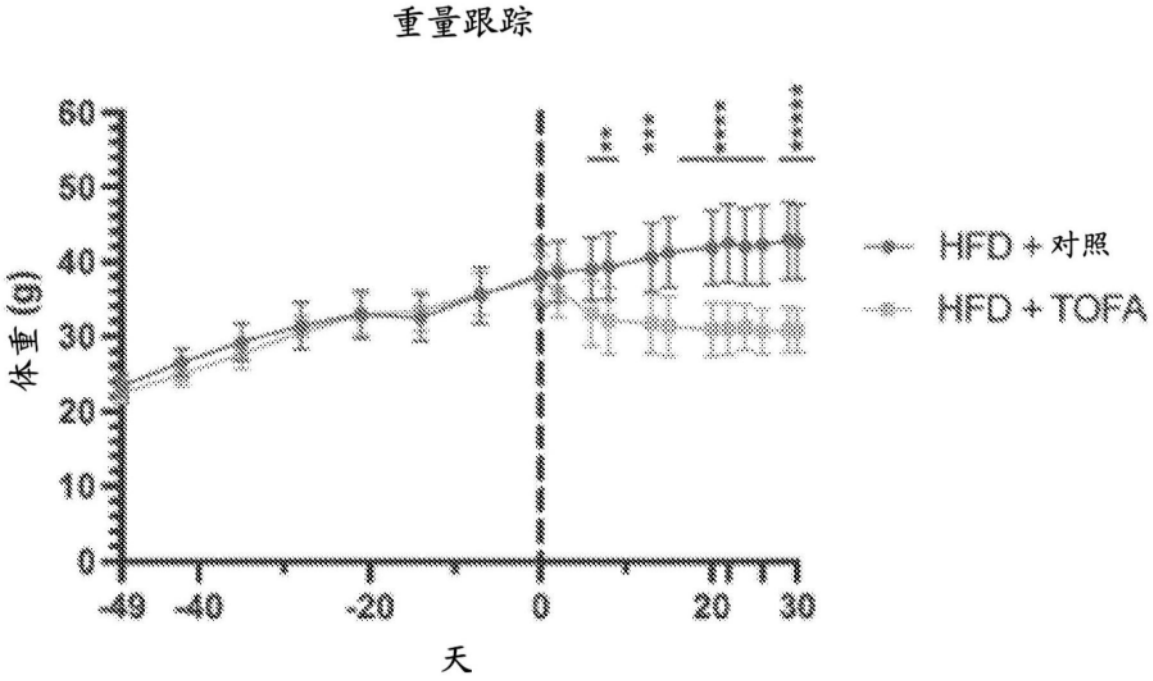

重量跟踪
体重(g)
60
50
40
30
20
10
0
-49
-40
-20
0
20
30
天
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2B

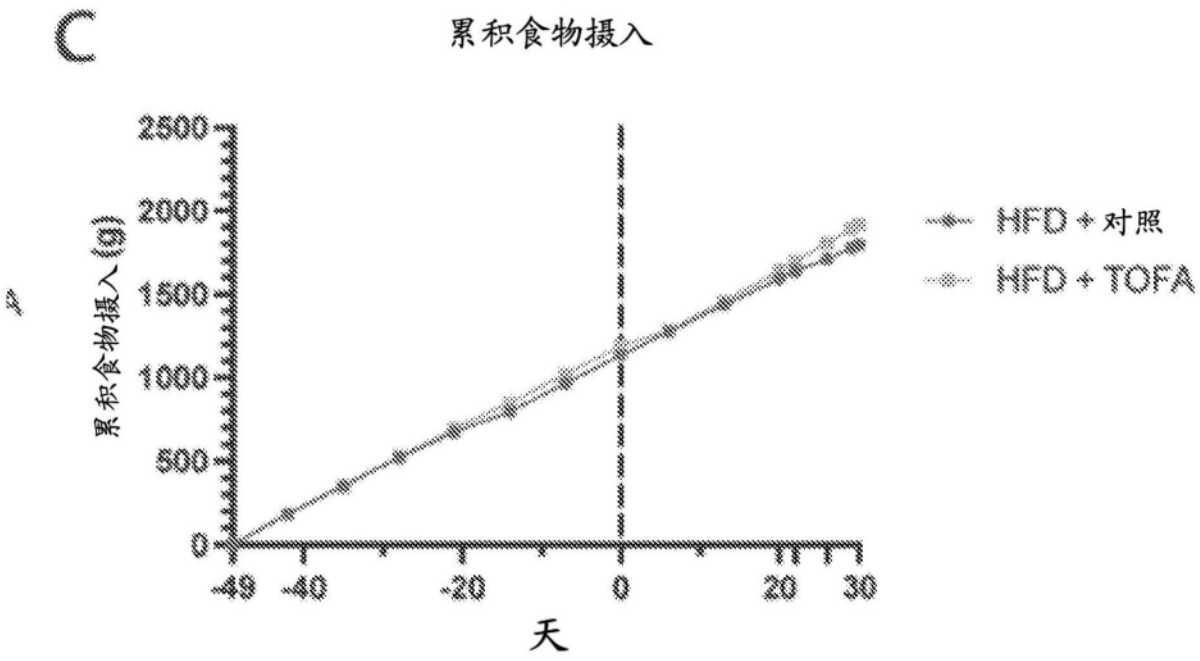

C
累积食物摄入
累积食物摄入(g)
2500
2000
1500
1000
500
0
-49
-40
-20
0
20
30
天
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2C

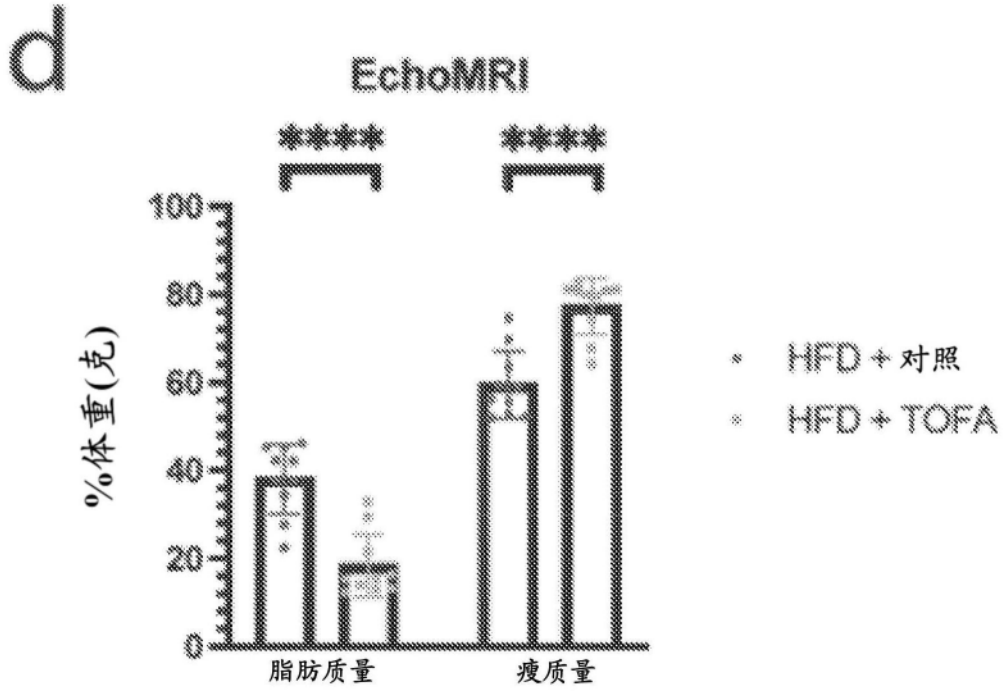

d
EchoMRI
****
****
%体重(克)
100
80
60
40
20
0
脂肪质量
瘦质量
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2D

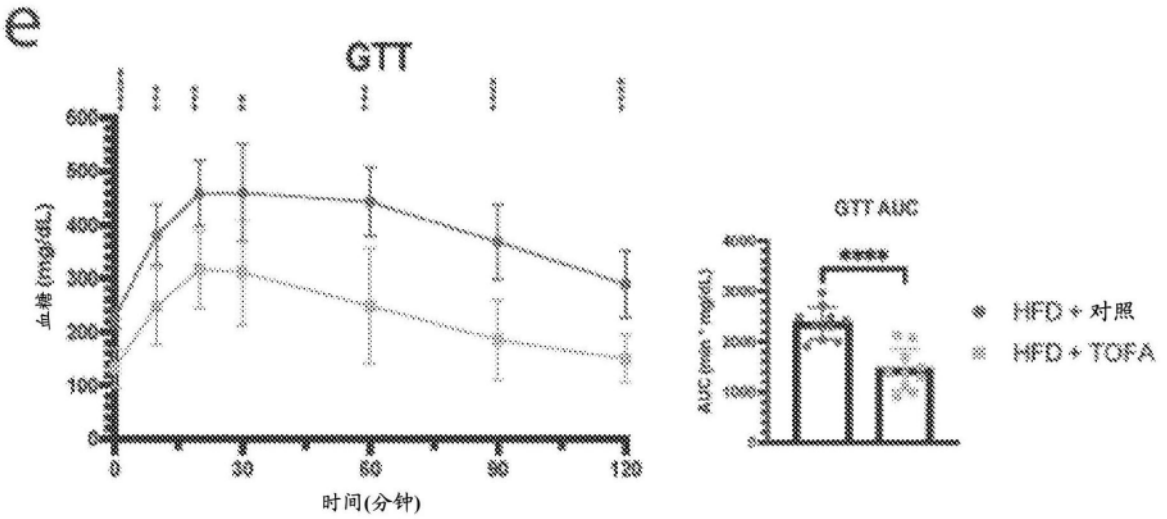

e
GTT
血糖(mg/dL)
时间(分钟)
GTT AUC
AUC(min * mg/dL)
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2E

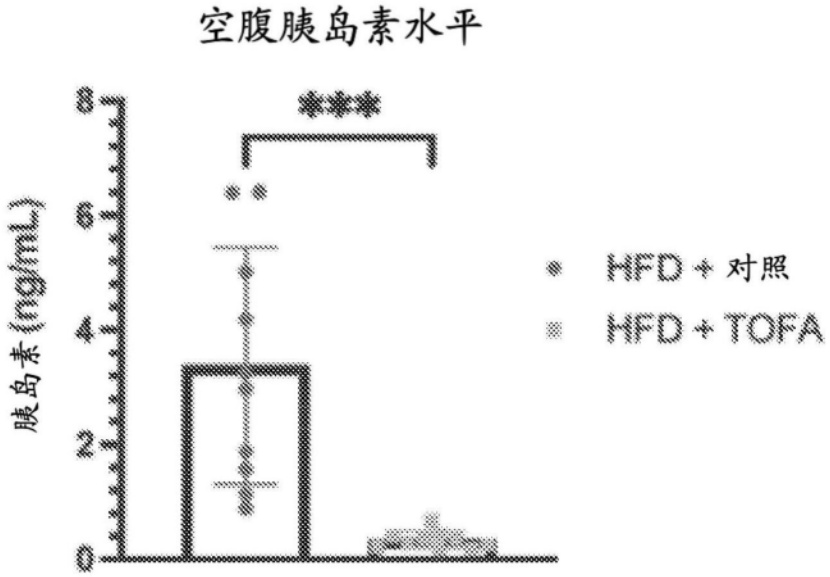

空腹胰岛素水平
胰岛素(ng/mL)
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2F

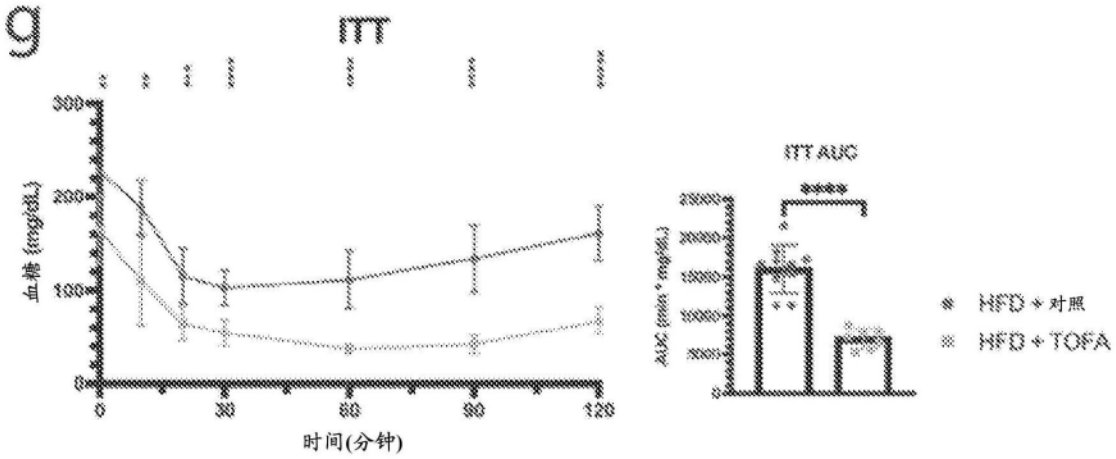

g
ITT
血糖 (mg/dL)
时间(分钟)
ITT AUC
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2G

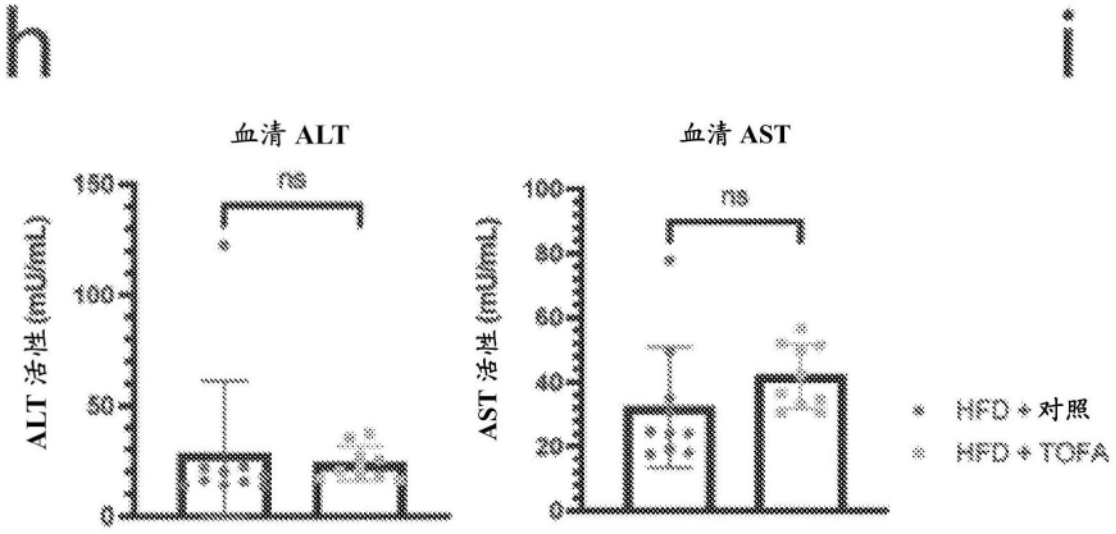

h
i
血清 ALT
ALT 活性 (mU/mL)
血清 AST
AST 活性 (mU/mL)
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2H

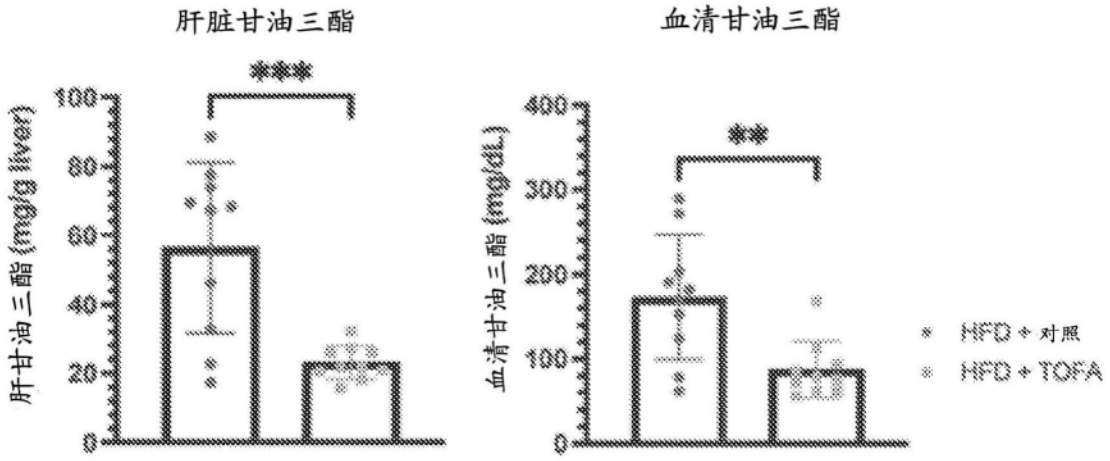

肝脏甘油三酯
血清甘油三酯
***
**
肝甘油三酯(mg/g liver)
血清甘油三酯(mg/dL)
0
20
40
60
80
100
100
200
300
400
HFD + 对照
HFD + TOFA

图2I


a
开始
收获
时间(周) 0
8
12
自由进食 CDAHFD 喂养
溶媒或
TOFA 灌胃

图3A

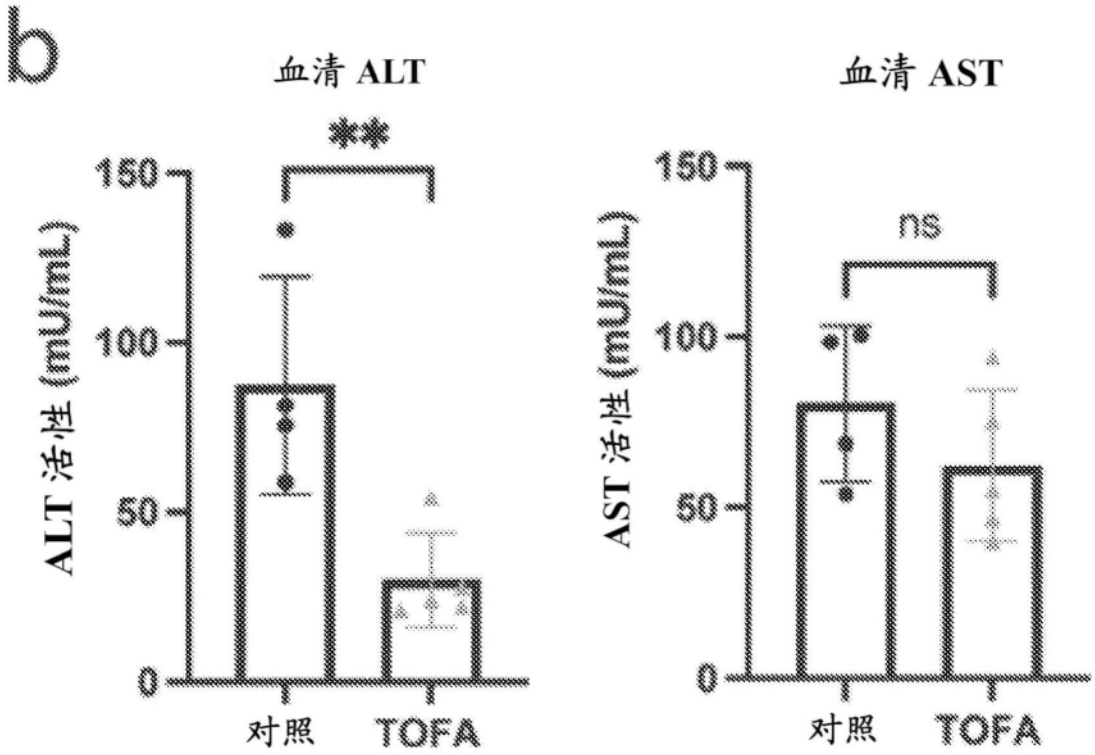

b
血清 ALT
**
ALT 活性 (mU/mL)
150
100
50
0
对照
TOFA
血清 AST
ns
AST 活性 (mU/mL)
150
100
50
0
对照
TOFA

图3B

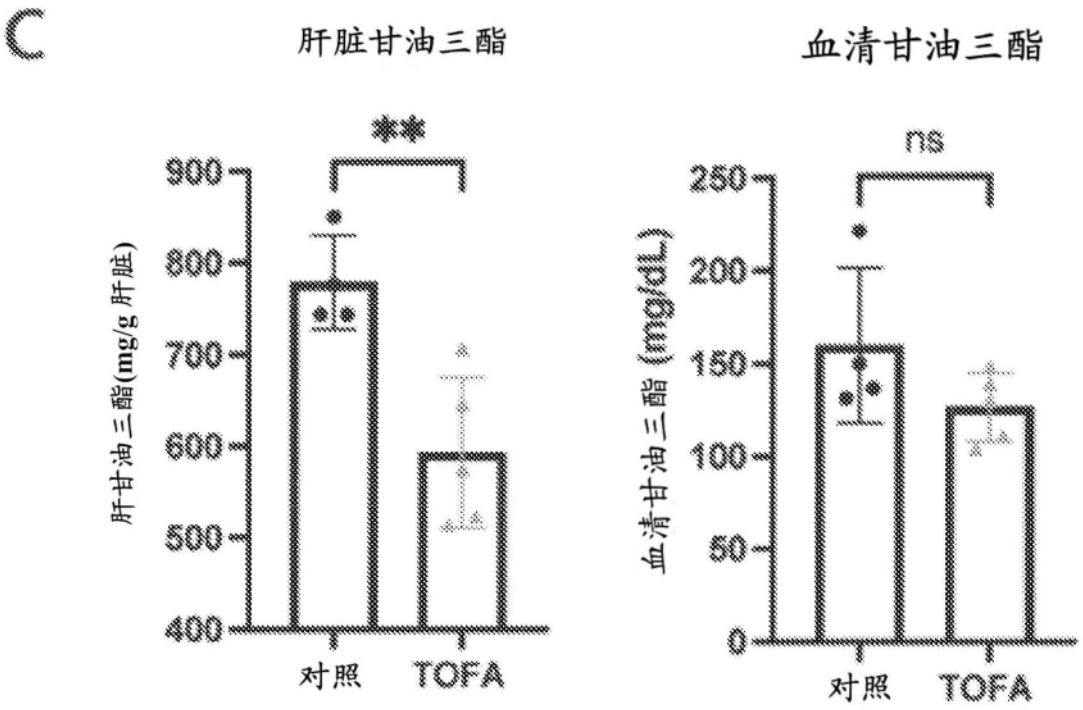

C
肝脏甘油三酯
**
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
900
800
700
600
500
400
对照
TOFA
血清甘油三酯
ns
血清甘油三酯 (mg/dL)
250
200
150
100
50
0
对照
TOFA

图3C

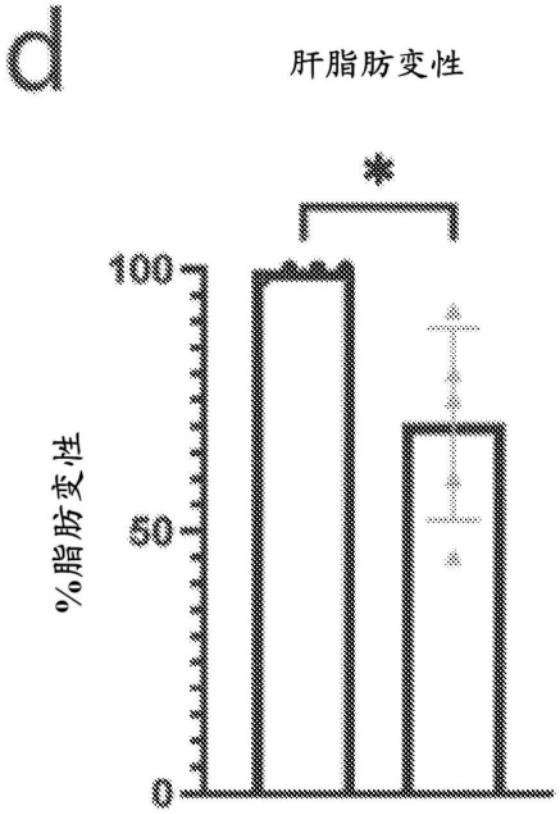

d
肝脂肪变性
*
100
50
0
%脂肪变性

图3D

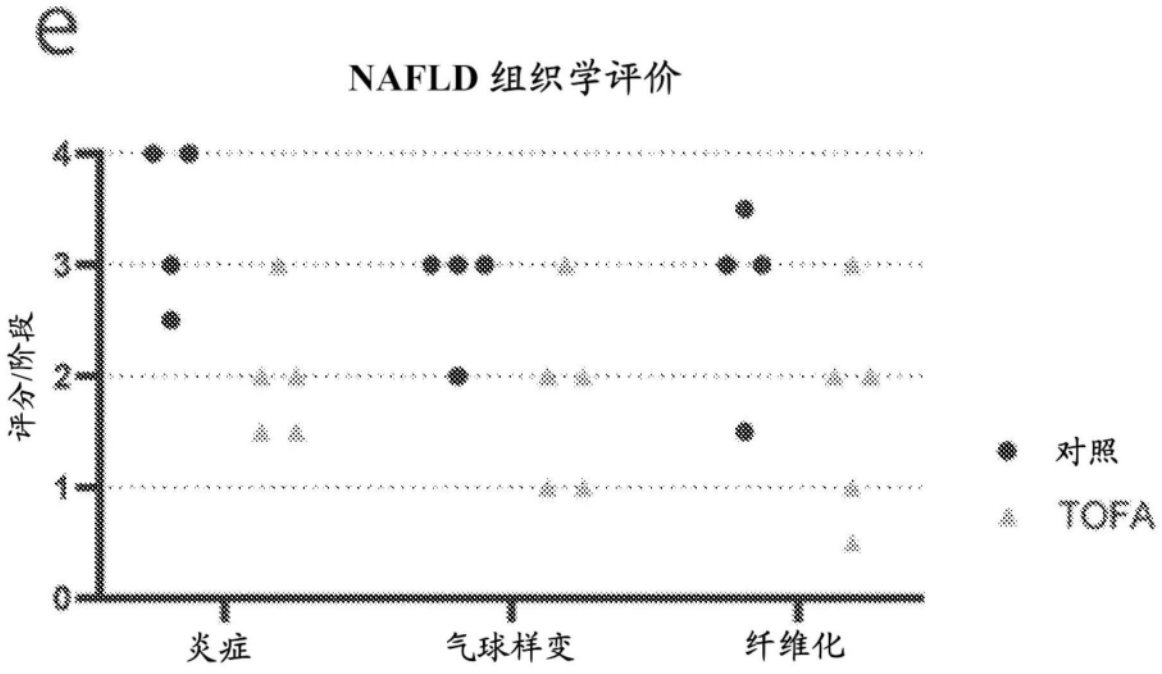

e
NAFLD 组织学评价
4
3
2
1
0
评分/阶段
炎症
气球样变
纤维化
对照
TOFA

图3E

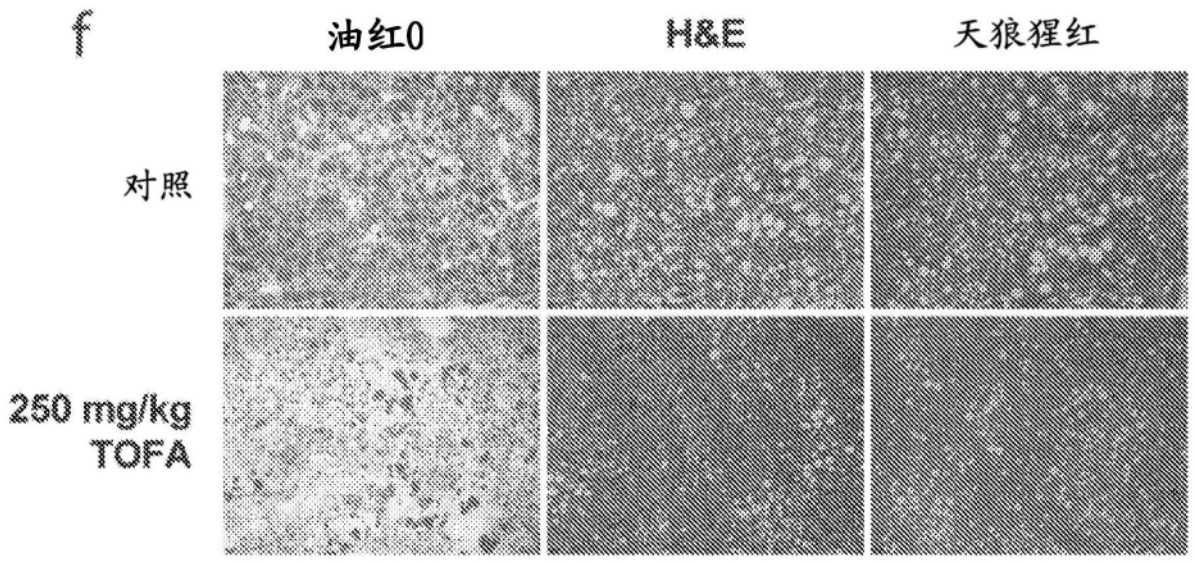

f
油红0
H&E
天狼猩红
对照
250 mg/kg
TOFA

图3F

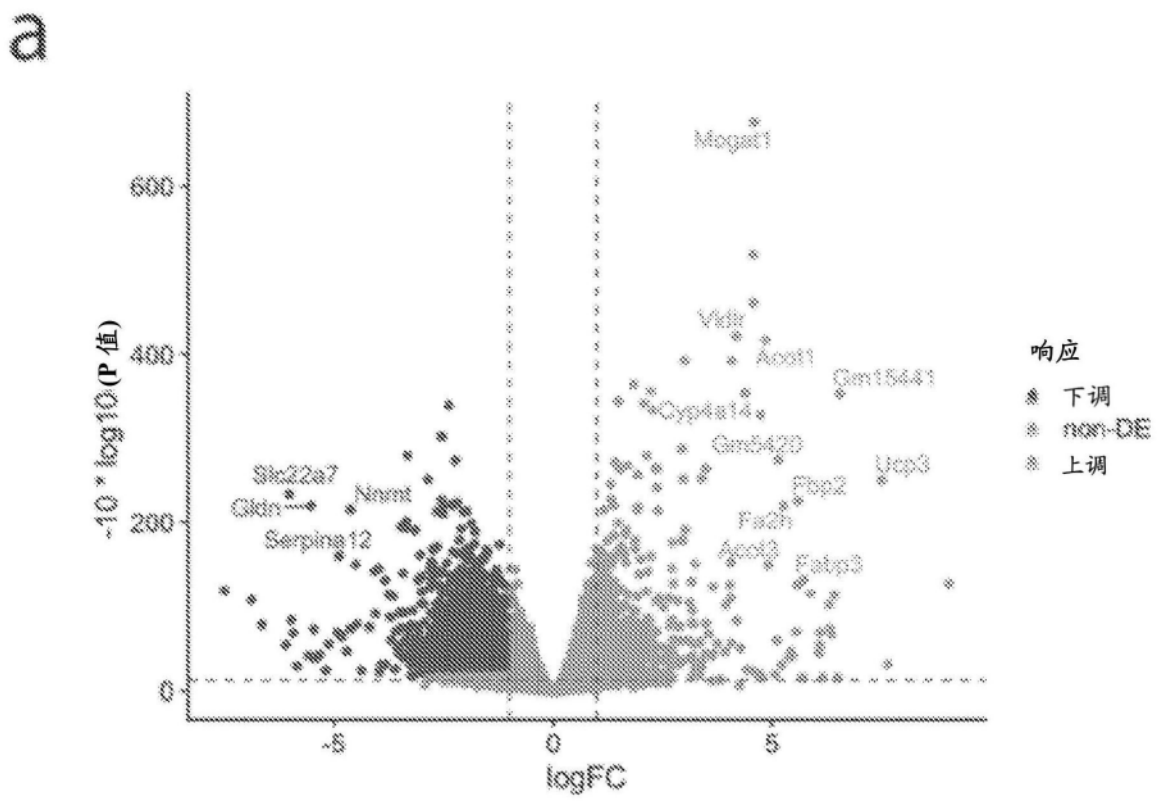

a
600
400
200
0
-10 * log10(P值)
-5
0
5
logFC
Mogat1
Vldlr
Acot1
Gm15441
Cyp4a14
Gm6420
Ucp3
Fbp2
Fa2h
Acot8
Fabp3
Slc22a7
Nnmt
Gldn
Serping12
响应
下调
non-DE
上调

图4A

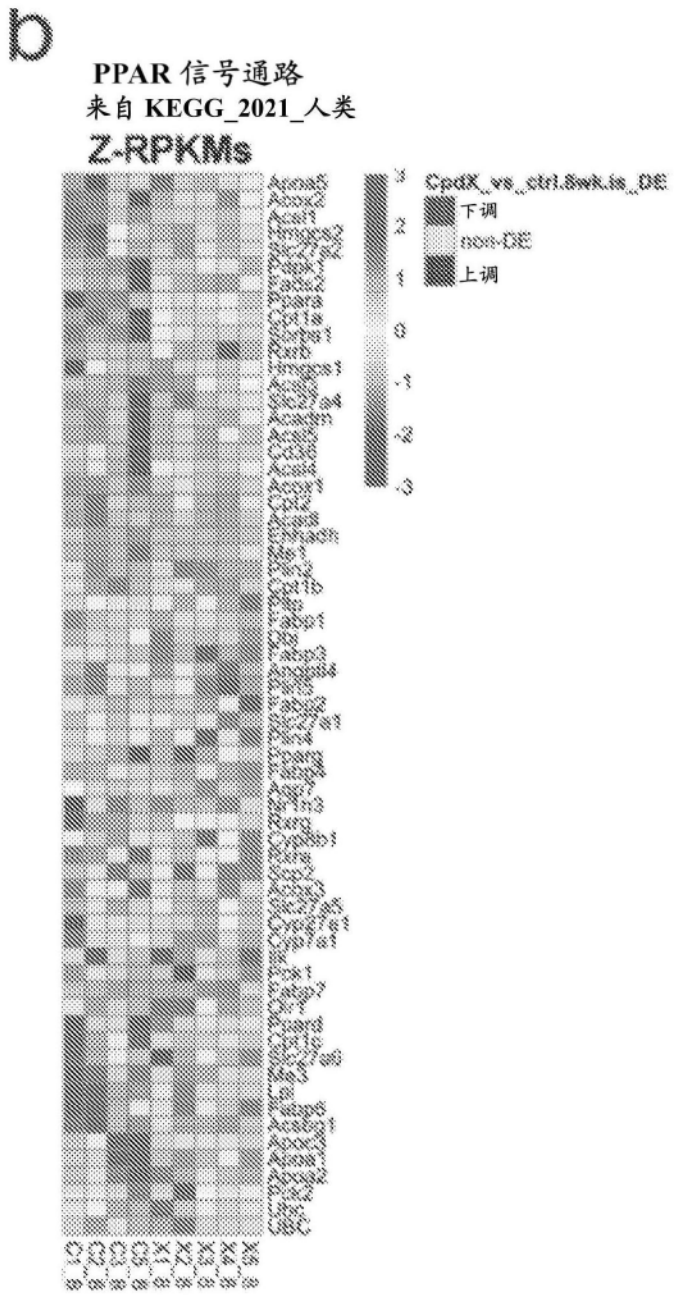

b
PPAR 信号通路
来自 KEGG_2021_人类
Z-RPKMs
CpdX_vs_ctrl.8wk.is_DE
下调
non-DE
上调
3
2
1
0
-1
-2
-3

图4B

C

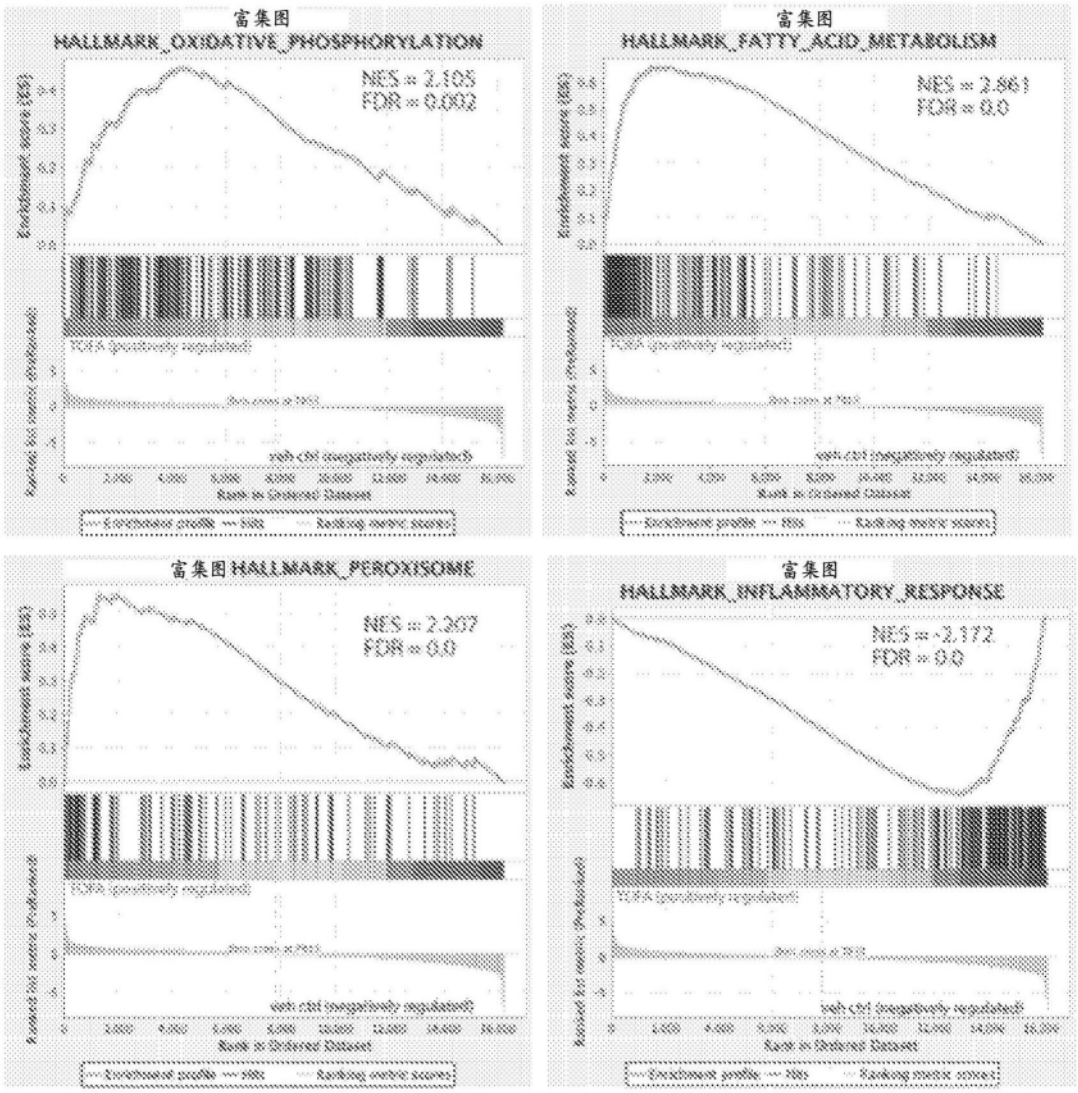

富集图
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION
NES = 2.185
FDR = 0.002
富集图
HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM
NES = 2.861
FDR = 0.0
富集图 HALLMARK_PEROXISOME
NES = 2.307
FDR = 0.0
富集图
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE
NES = -2.172
FDR = 0.0

图4C

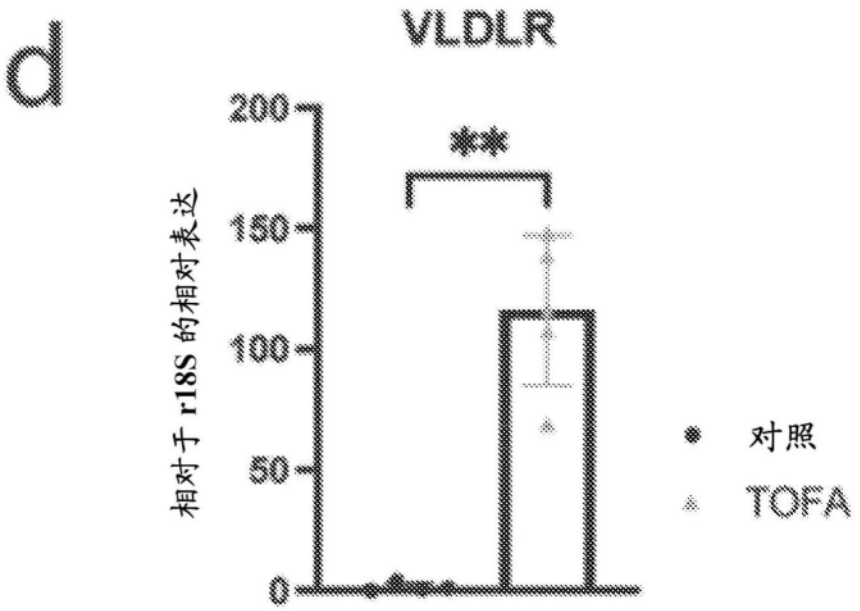

d
VLDLR
200
150
100
50
0
**
相对于 r18S 的相对表达
对照
TOFA

图4D

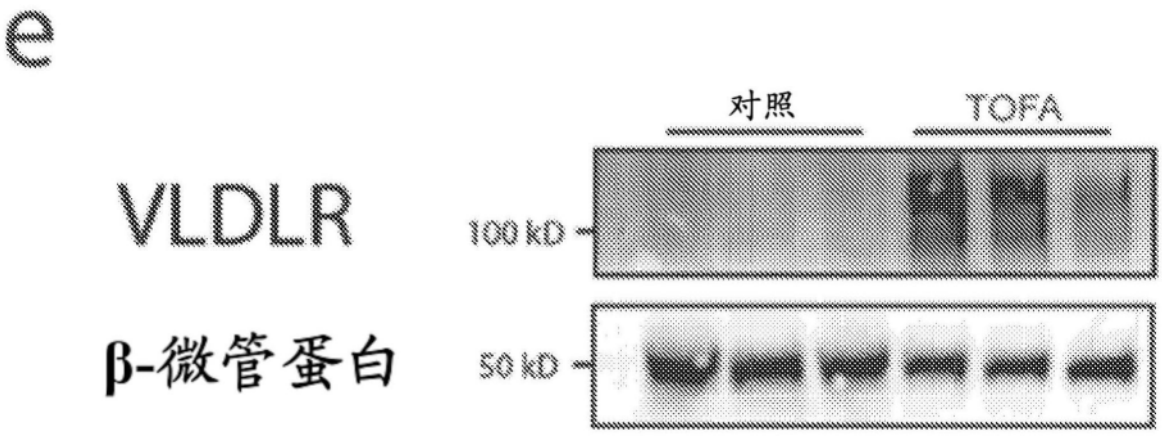

e
对照
TOFA
VLDLR
100 kD
β-微管蛋白
50 kD

图4E

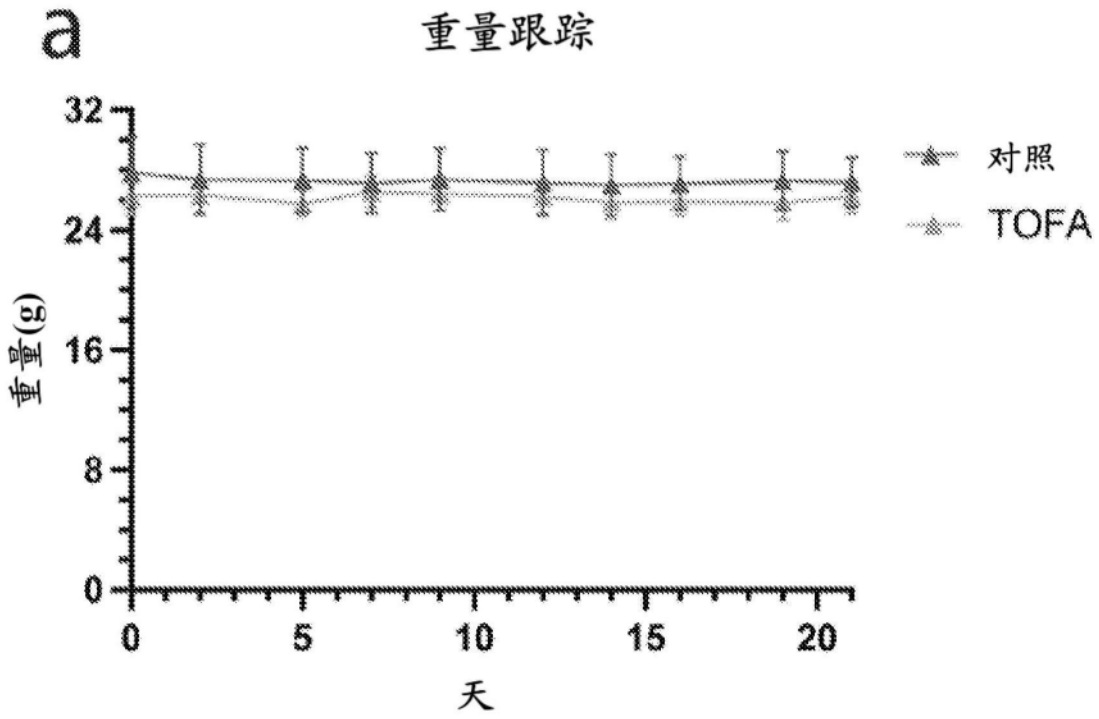

a
重量跟踪
32
24
16
8
0
重量(g)
0
5
10
15
20
天
对照
TOFA

图5A

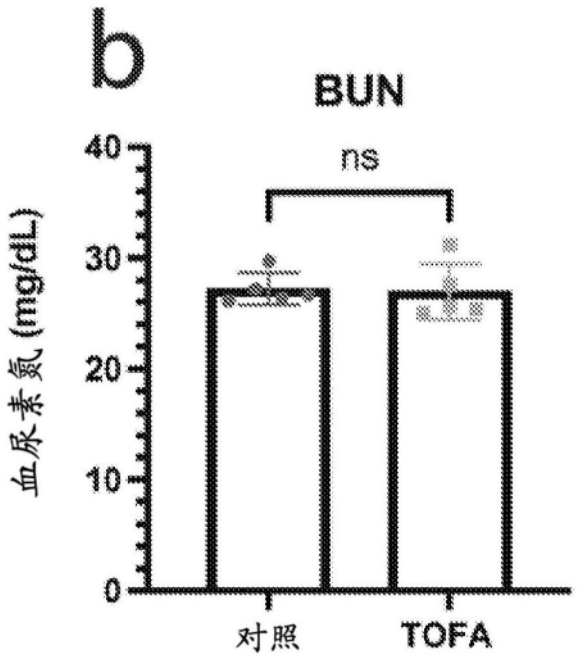

b
BUN
ns
40
30
20
10
0
血尿素氮 (mg/dL)
对照
TOFA

图5B

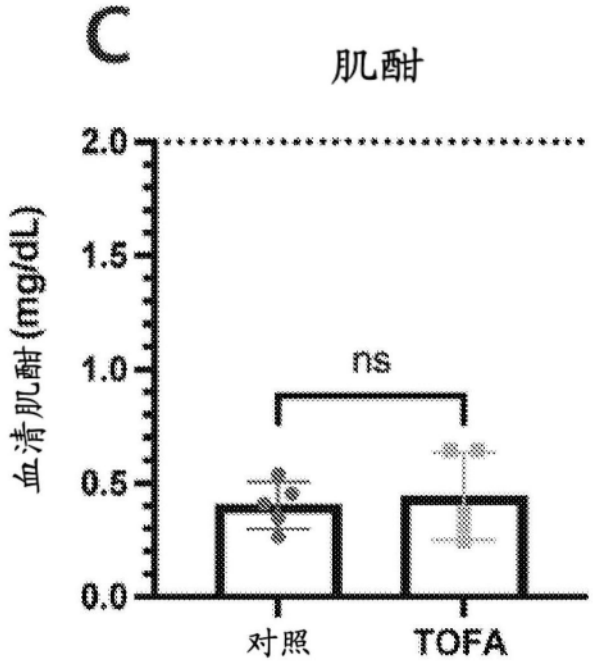

C
肌酐
血清肌酐(mg/dL)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
对照
TOFA

图5C

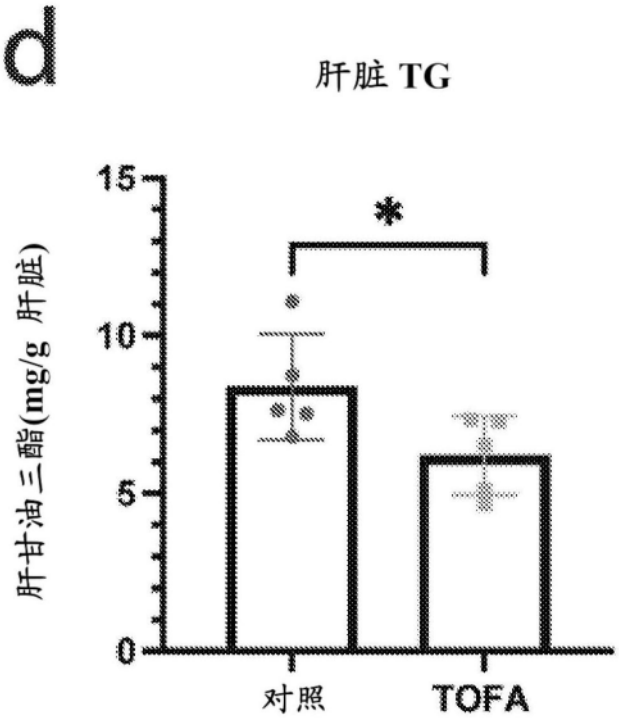

d
肝脏 TG
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
15
10
5
0
*
对照
TOFA

图5D

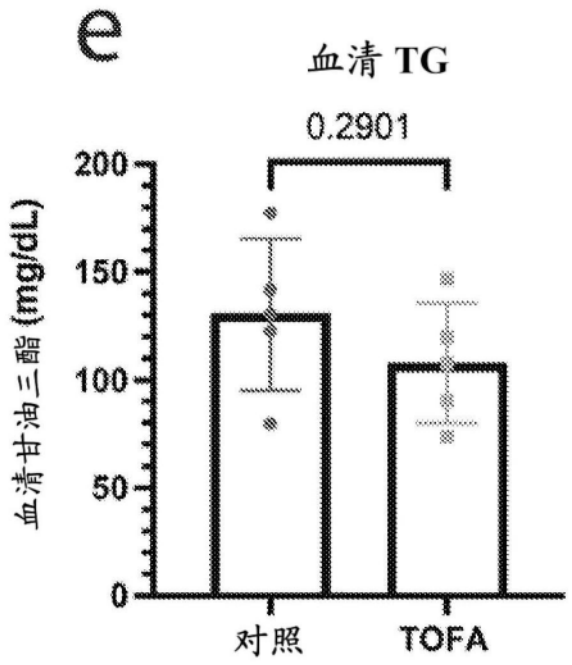

e
血清 TG
0.2901
血清甘油三酯 (mg/dL)
200
150
100
50
0
对照
TOFA

图5E

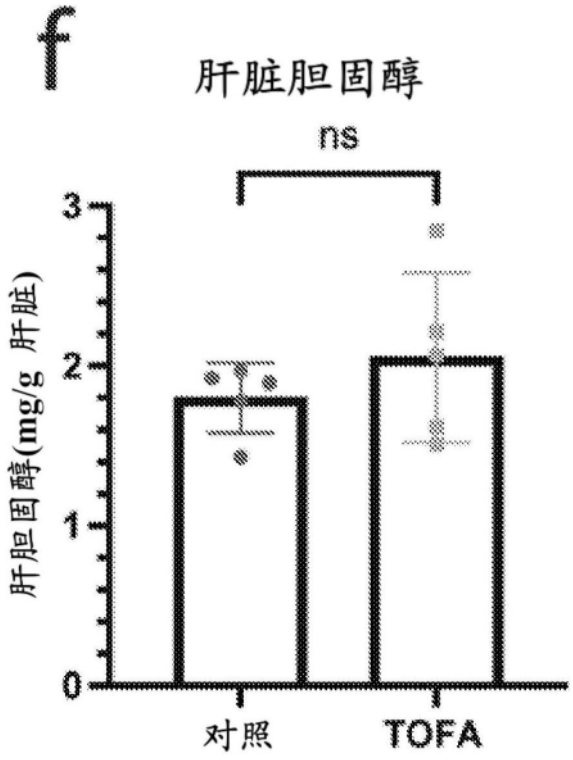

f
肝脏胆固醇
ns
肝胆固醇(mg/g 肝脏)
3
2
1
0
对照
TOFA

图5F

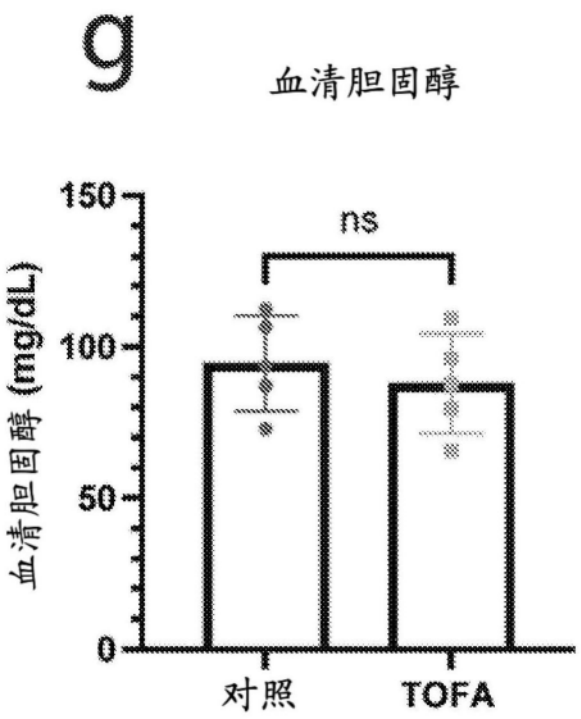

g
血清胆固醇
ns
150
100
50
0
血清胆固醇 (mg/dL)
对照
TOFA

图5G

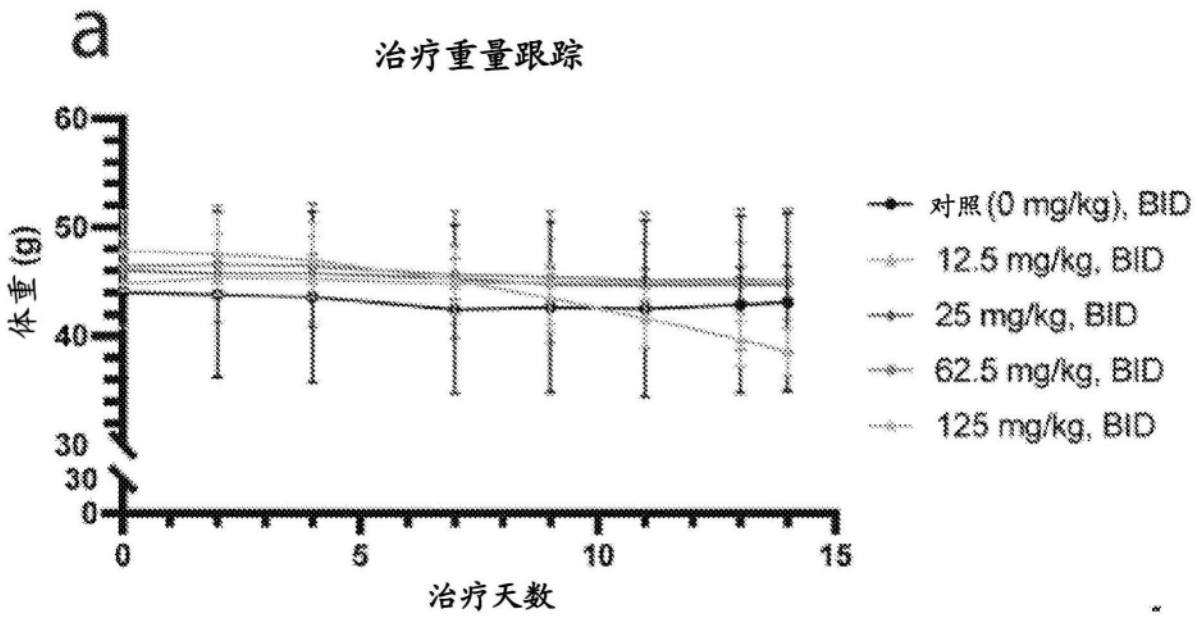

a
治疗重量跟踪
60
50
40
30
30
0
体重(g)
0
5
10
15
治疗天数
对照(0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID

图6A

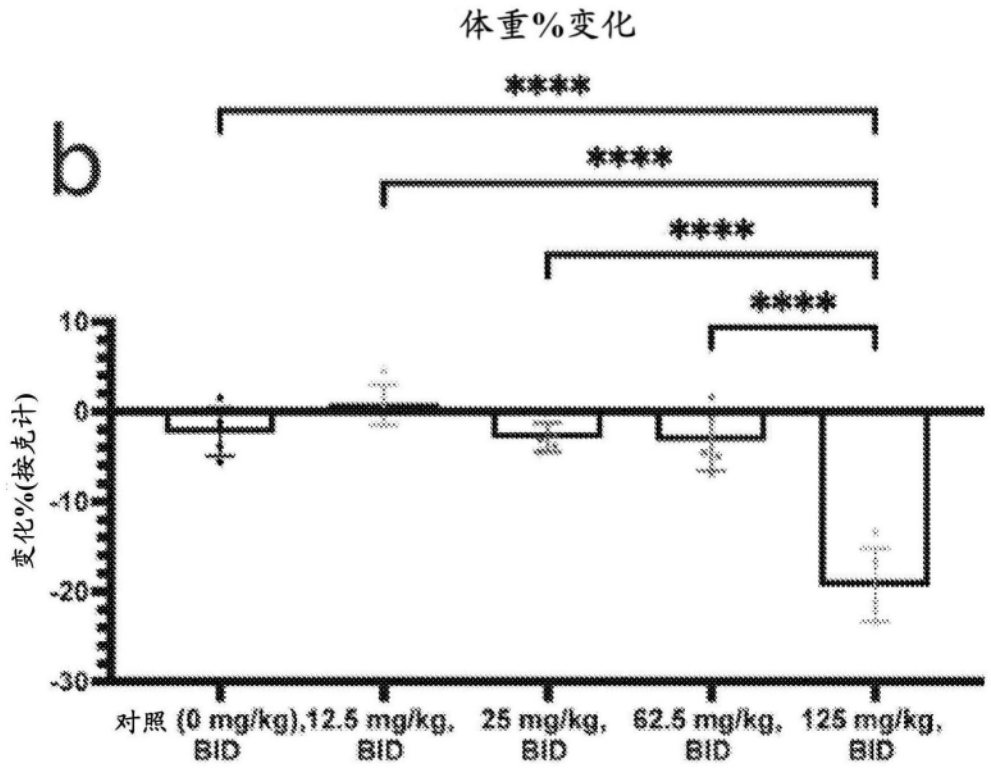

体重%变化
b
****
****
****
****
变化%(按克计)
10
0
-10
-20
-30
对照 (0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID

图6B

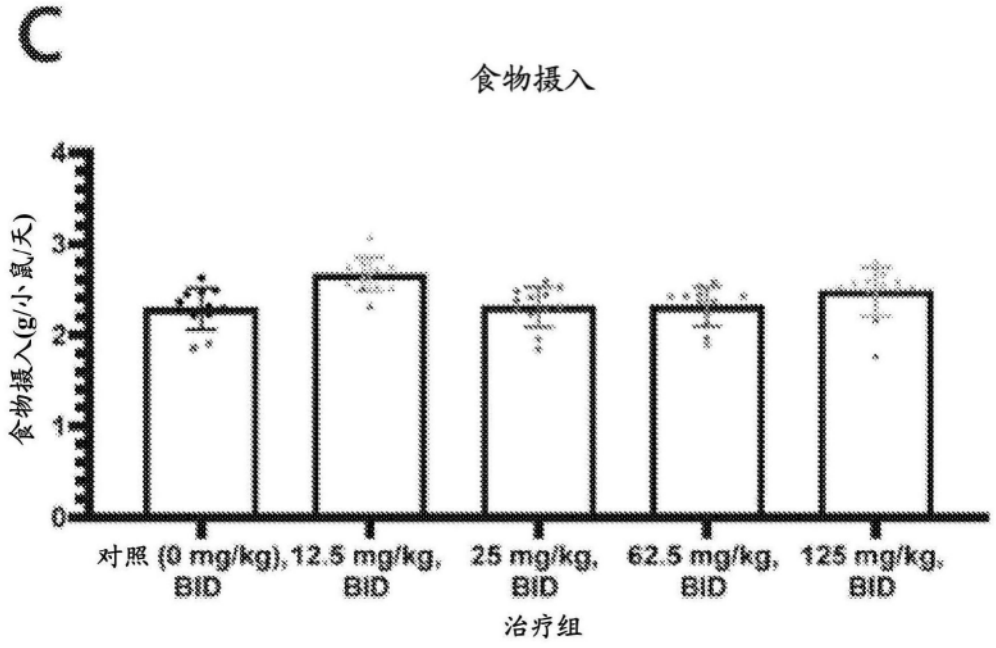

C
食物摄入
食物摄入(g/小鼠/天)
4
3
2
1
0
对照 (0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID
治疗组

图6C

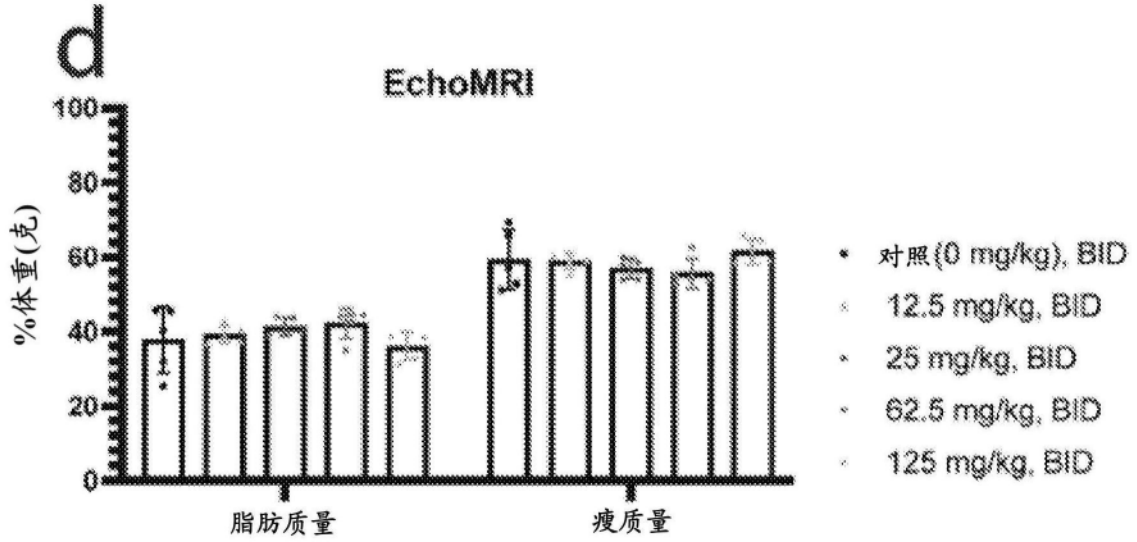

d
EchoMRI
%体重(克)
100
80
60
40
20
0
脂肪质量
瘦质量
对照(0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID

图6D

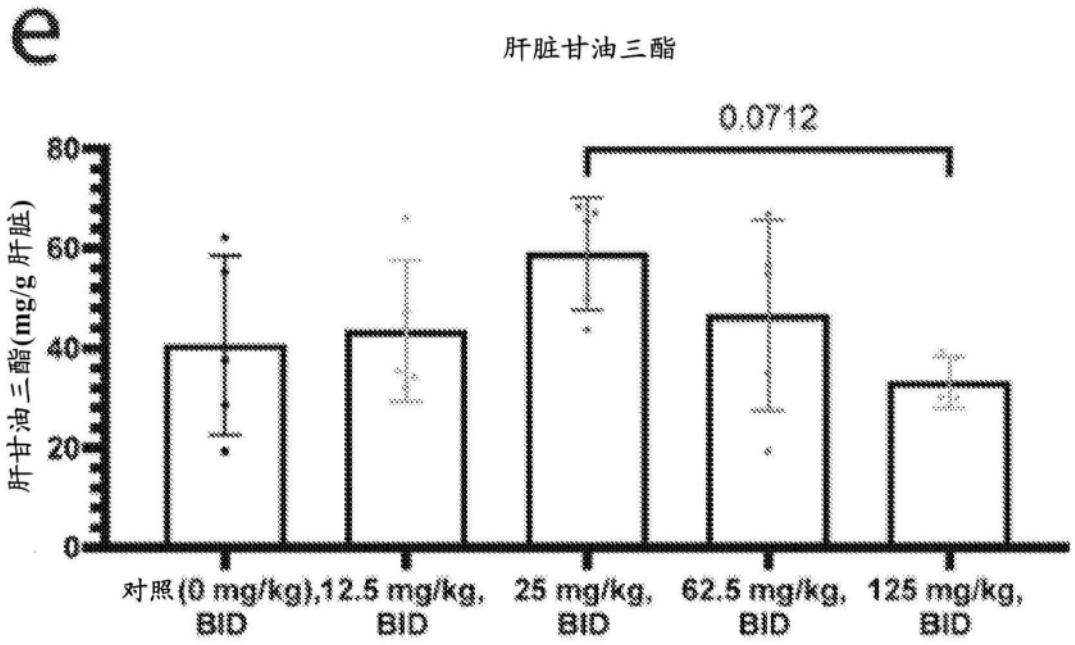

e
肝脏甘油三酯
0.0712
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
80
60
40
20
0
对照(0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID

图6E

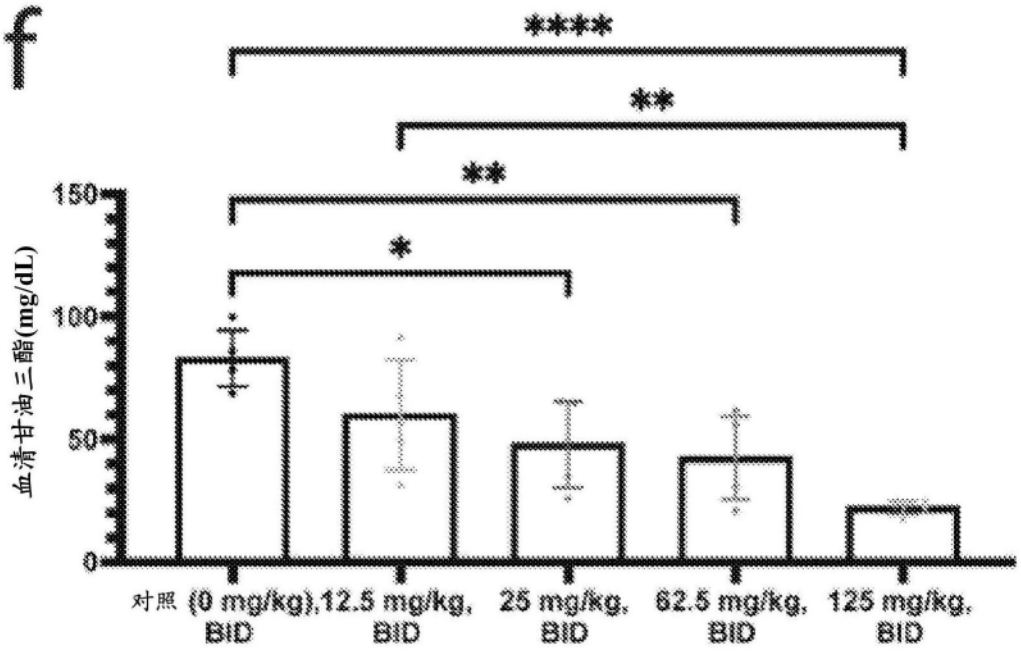

f
****
**
**
*
血清甘油三酯(mg/dL)
150
100
50
0
对照 (0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID

图6F

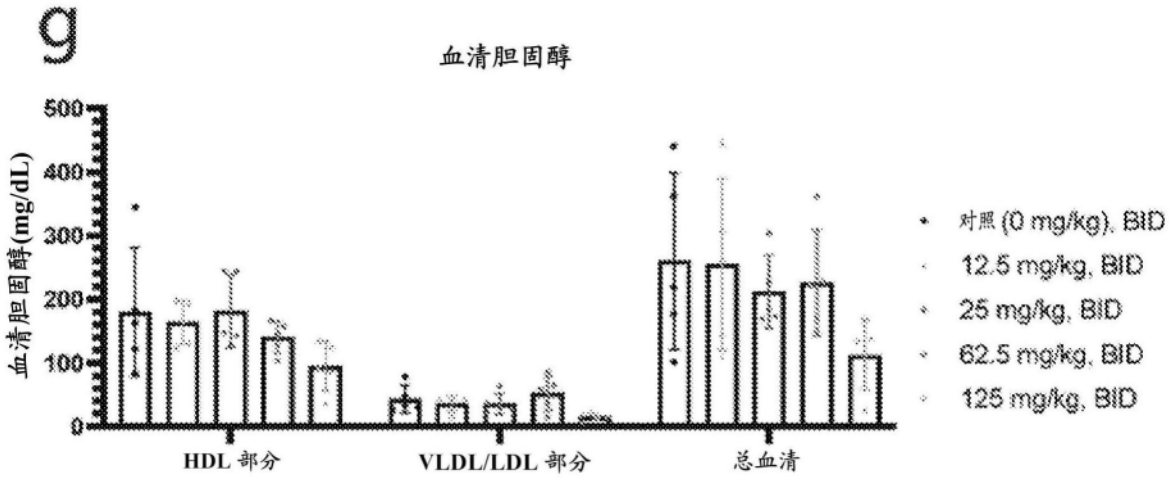

g
血清胆固醇
血清胆固醇(mg/dL)
500
400
300
200
100
0
HDL 部分
VLDL/LDL 部分
总血清
对照 (0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID

图6G

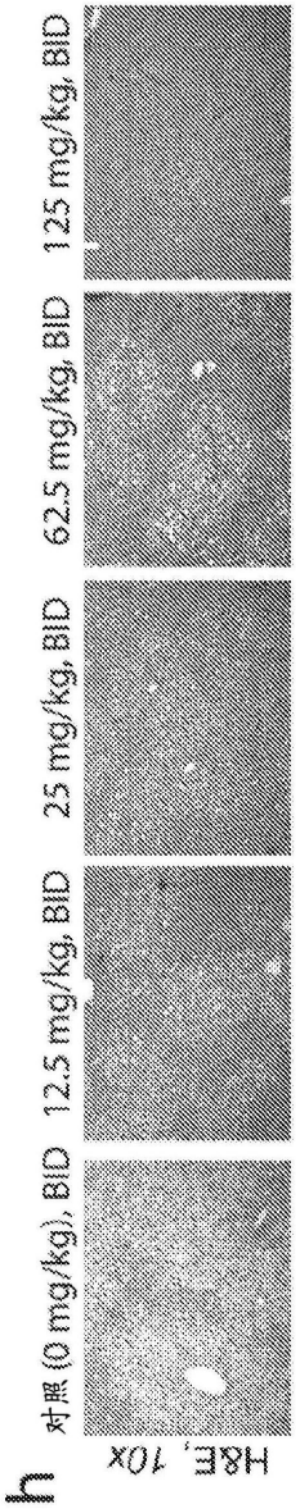

h
H&E, 10x
对照 (0 mg/kg), BID
12.5 mg/kg, BID
25 mg/kg, BID
62.5 mg/kg, BID
125 mg/kg, BID

图6H

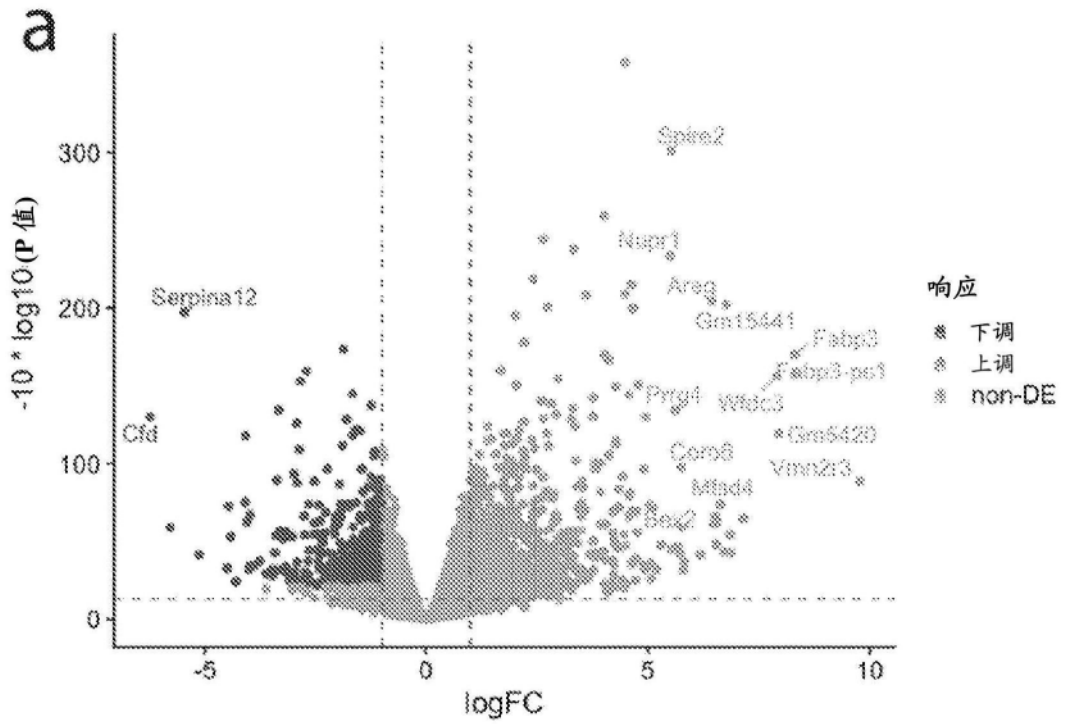

a
-10 * log10(P 值)
300
200
100
0
-5
0
5
10
logFC
Spire2
Nupr1
Areg
Gm15441
Fabp3
Fabp3-ps1
Prrg4
Wfdc3
Gm5420
Coro6
Vmn2r3
Mfsd4
Bex2
Serpina12
Cfd
响应
下调
上调
non-DE

图7A

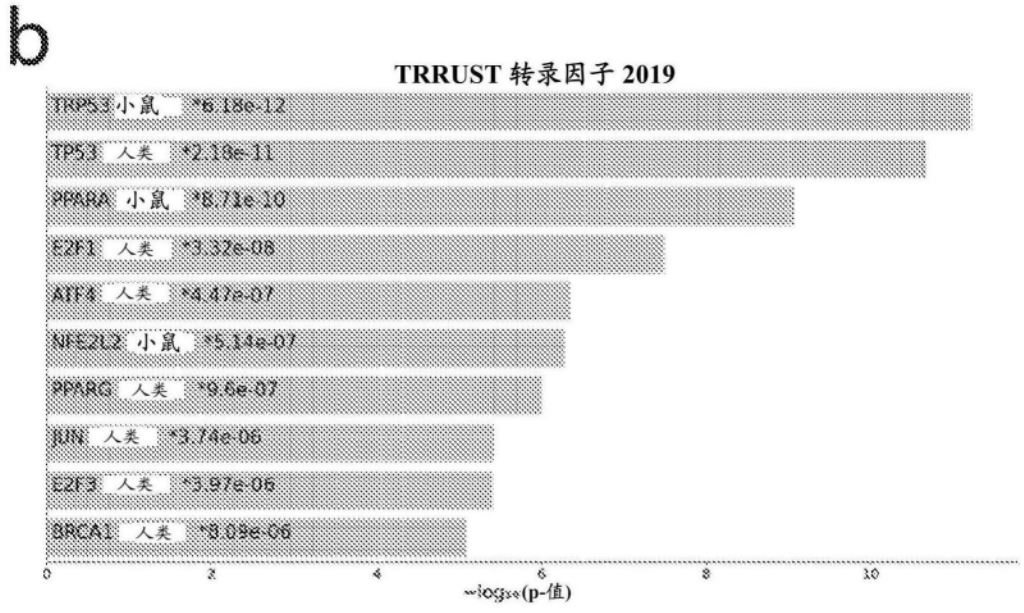

b
TRRUST 转录因子 2019
TRP53 小鼠 *6.18e-12
TP53 人类 *2.18e-11
PPARA 小鼠 *8.71e-10
E2F1 人类 *3.32e-08
ATF4 人类 *4.47e-07
NFE2L2 小鼠 *5.14e-07
PPARG 人类 *9.6e-07
JUN 人类 *3.74e-06
E2F3 人类 *3.97e-06
BRCA1 人类 *8.09e-06
0
2
4
6
8
10
~log10(p-值)

图7B

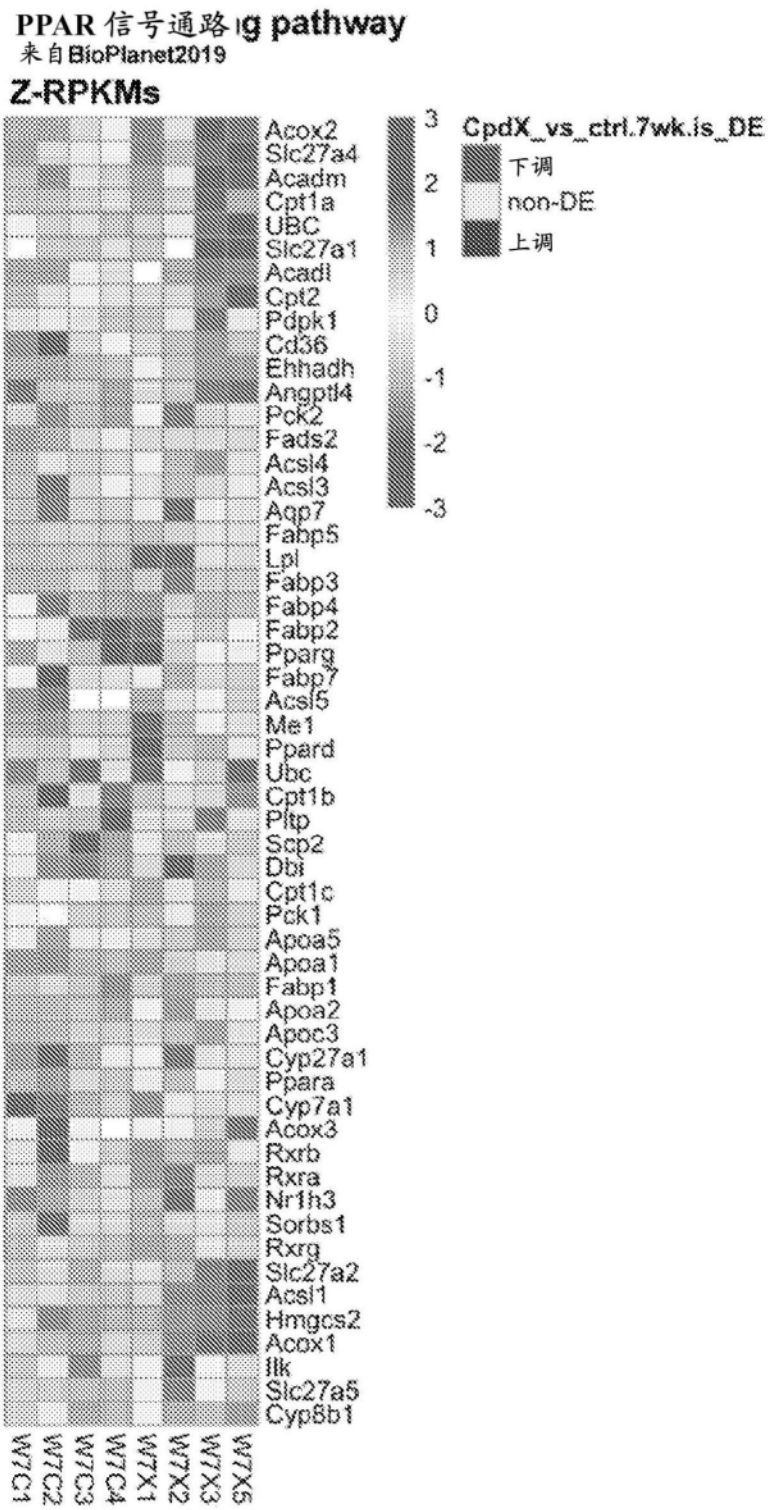

PPAR 信号通路ıg pathway
来自BioPlanet2019
Z-RPKMs
Acox2
Slc27a4
Acadm
Cpt1a
UBC
Slc27a1
Acadl
Cpt2
Pdpk1
Cd36
Ehhadh
Angptl4
Pck2
Fads2
Acsl4
Acsl3
Aqp7
Fabp5
Lpl
Fabp3
Fabp4
Fabp2
Pparg
Fabp7
Acsl5
Me1
Ppard
Ubc
Cpt1b
Pltp
Scp2
Dbi
Cpt1c
Pck1
Apoa5
Apoa1
Fabp1
Apoa2
Apoc3
Cyp27a1
Ppara
Cyp7a1
Acox3
Rxrb
Rxra
Nr1h3
Sorbs1
Rxrg
Slc27a2
Acsl1
Hmgcs2
Acox1
Ilk
Slc27a5
Cyp8b1
W7C1
W7C2
W7C3
W7C4
W7X1
W7X2
W7X3
W7X5
3
2
1
0
-1
-2
-3
CpdX_vs_ctrl.7wk.is_DE
下调
non-DE
上调

图7C

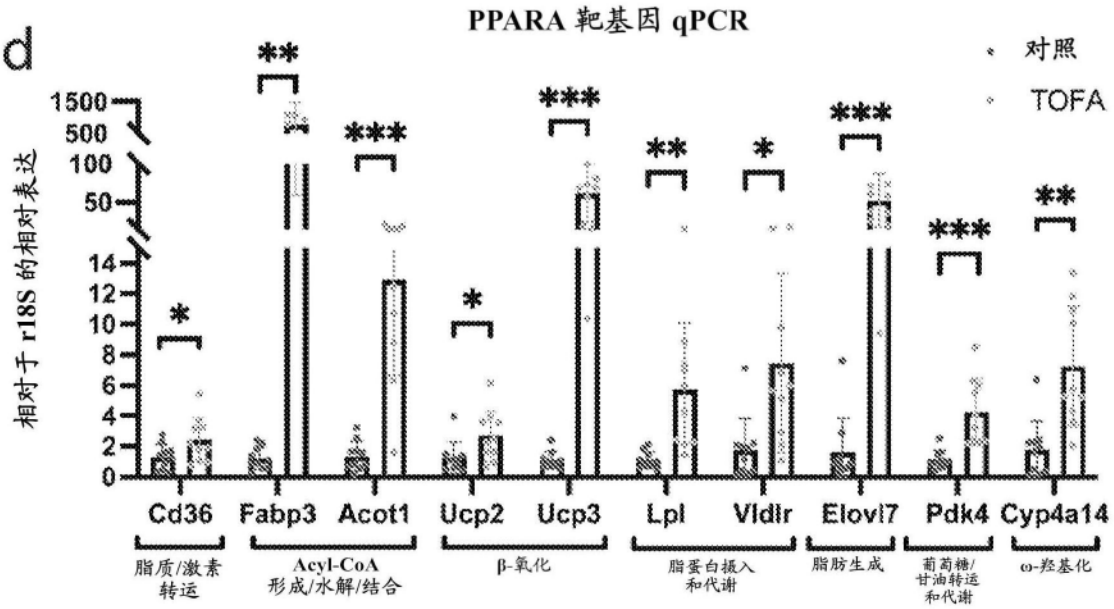

a
PPARA 靶基因 qPCR
对照
TOFA
相对于 r18S 的相对表达
1500
500
100
50
14
12
10
8
6
4
2
0
Cd36
Fabp3
Acot1
Ucp2
Ucp3
Lpl
Vldlr
Elovl7
Pdk4
Cyp4a14
脂质/激素转运
Acyl-CoA形成/水解/结合
β-氧化
脂蛋白摄入和代谢
脂肪生成
葡萄糖/甘油转运和代谢
ω-羟基化

图7D

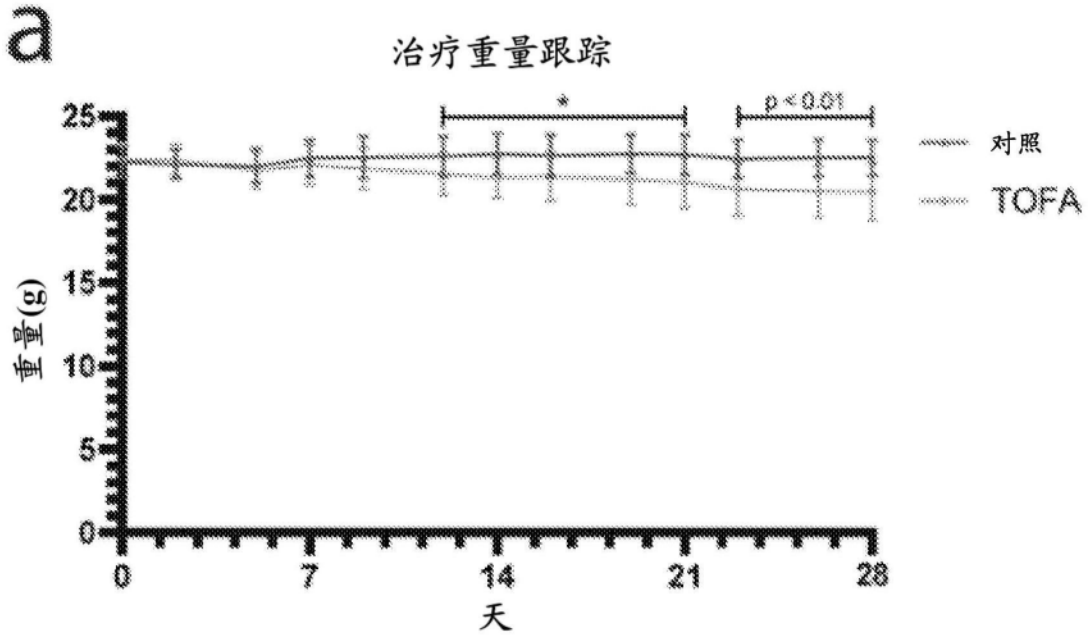

a
治疗重量跟踪
p < 0.01
对照
TOFA
重量(g)
25
20
15
10
5
0
0
7
14
21
28
天

图8A

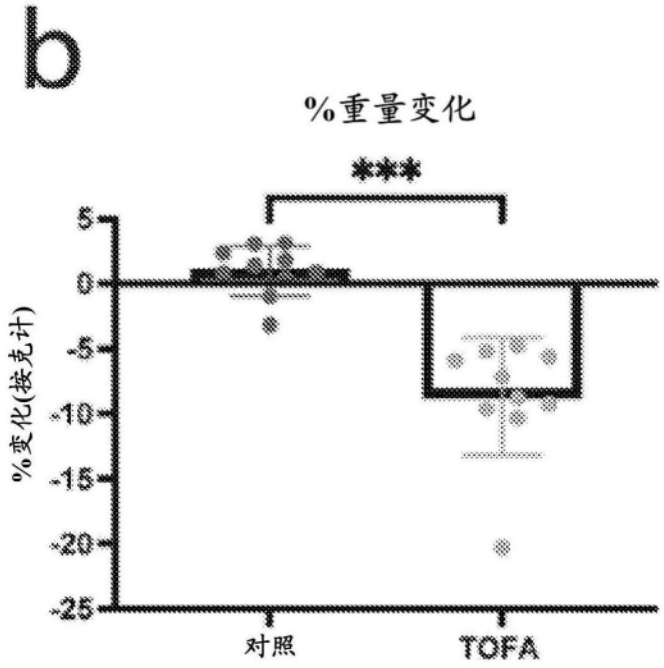

b
%重量变化
***
%变化(按克计)
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
对照
TOFA

图8B

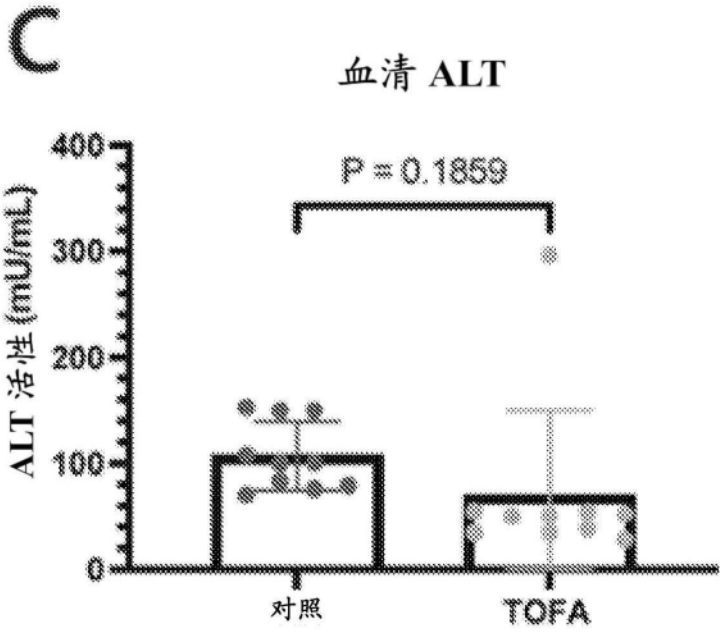

C
血清 ALT
P = 0.1859
ALT 活性 (mU/mL)
400
300
200
100
0
对照
TOFA

图8C

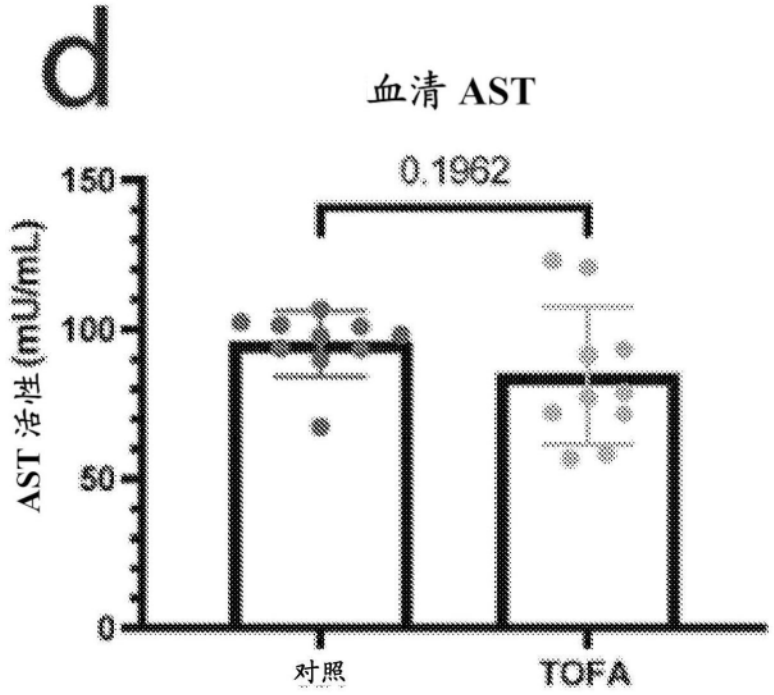

d
血清 AST
0.1962
AST 活性(mU/mL)
150
100
50
0
对照
TOFA

图8D

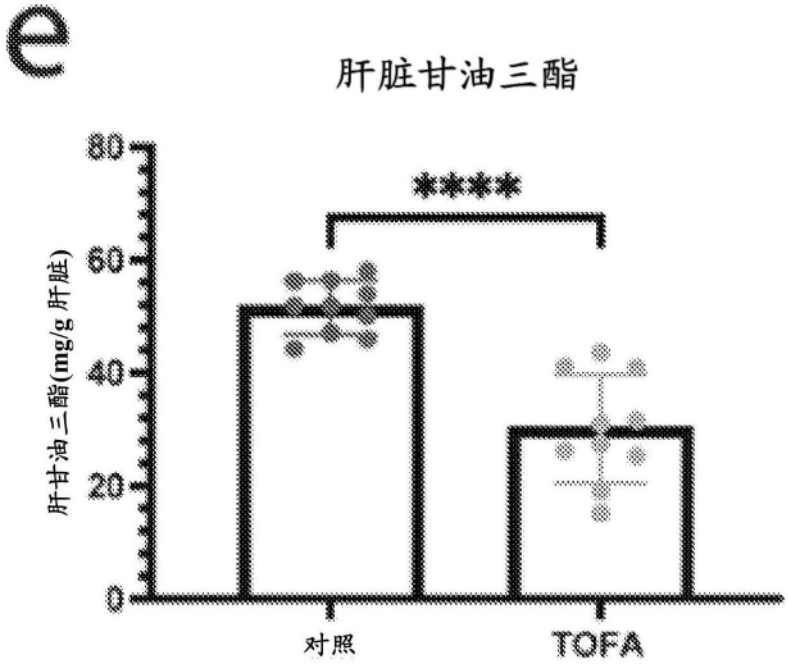

e
肝脏甘油三酯
****
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
80
60
40
20
0
对照
TOFA

图8E

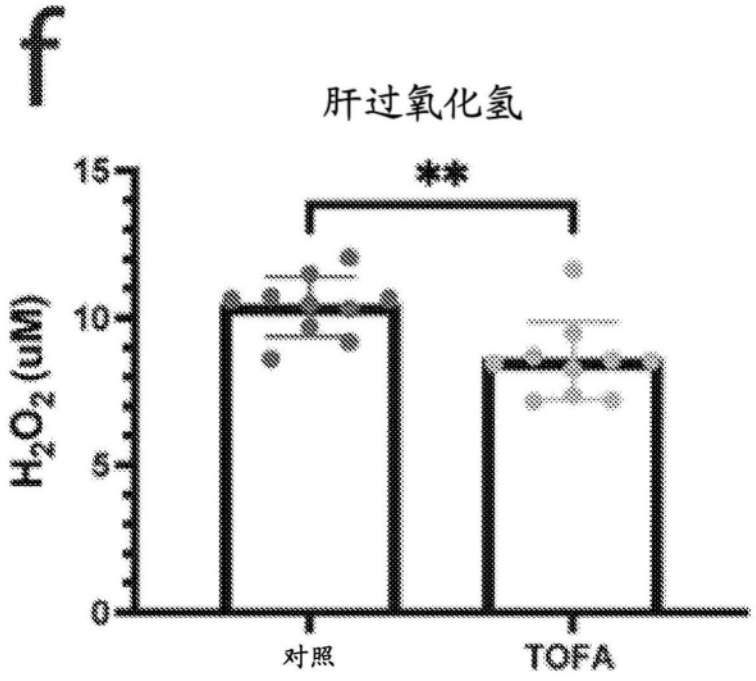

f
肝过氧化氢
**
15
10
5
0
$H_2O_2$ (uM)
对照
TOFA

图8F

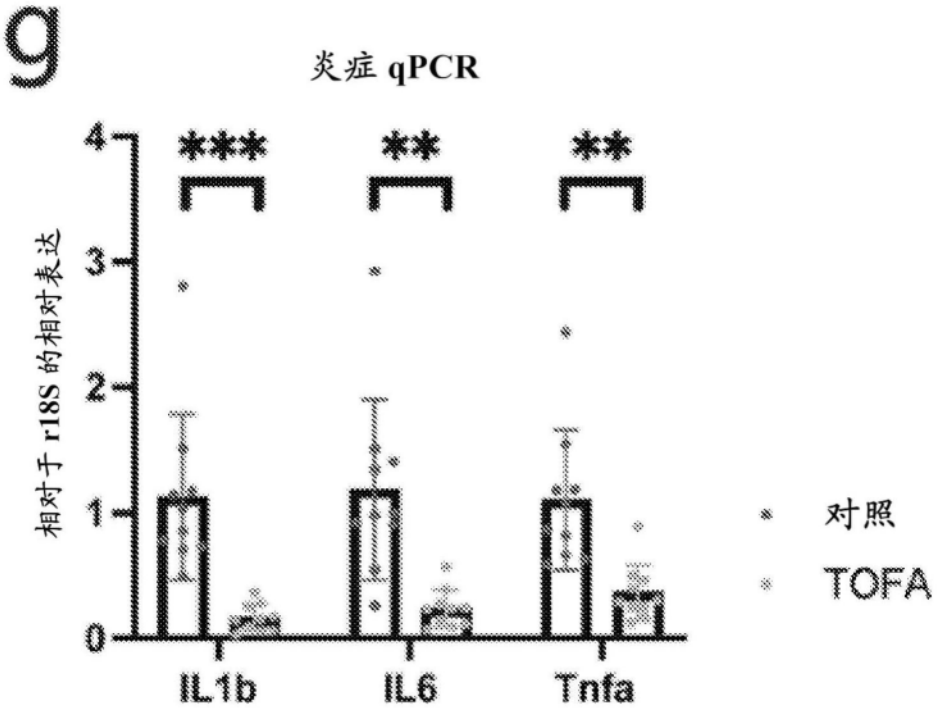

g
炎症 qPCR
***
**
**
4
3
2
1
0
相对于 r18S 的相对表达
IL1b
IL6
Tnfa
对照
TOFA

图8G

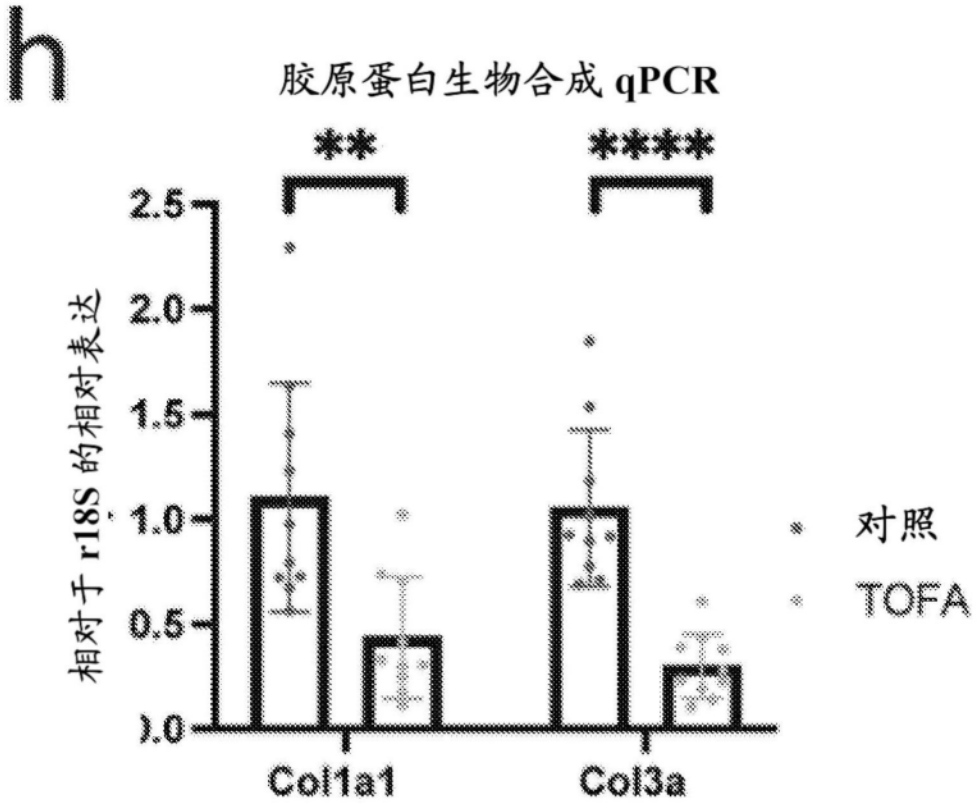

h
胶原蛋白生物合成 qPCR
**
****
相对于 r18S 的相对表达
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Col1a1
Col3a
对照
TOFA

图8H

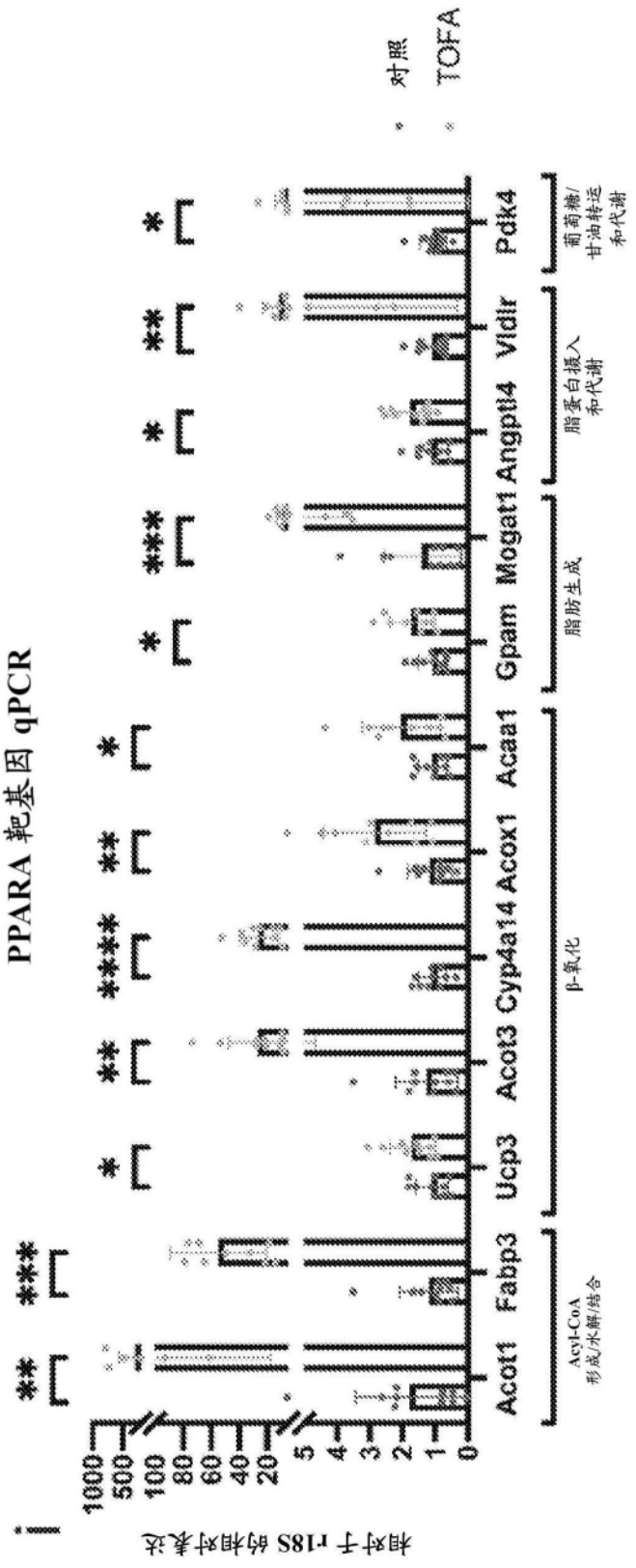

PPARA 靶基因 qPCR
相对于 r18S 的相对表达
对照
TOFA
Acot1
Fabp3
Ucp3
Acot3
Cyp4a14
Acox1
Acaa1
Gpam
Mogat1
Angptl4
Vldlr
Pdk4
Acyl-CoA 形成/水解/结合
β-氧化
脂肪生成
脂蛋白摄入和代谢
葡萄糖/甘油转运和代谢

图8I

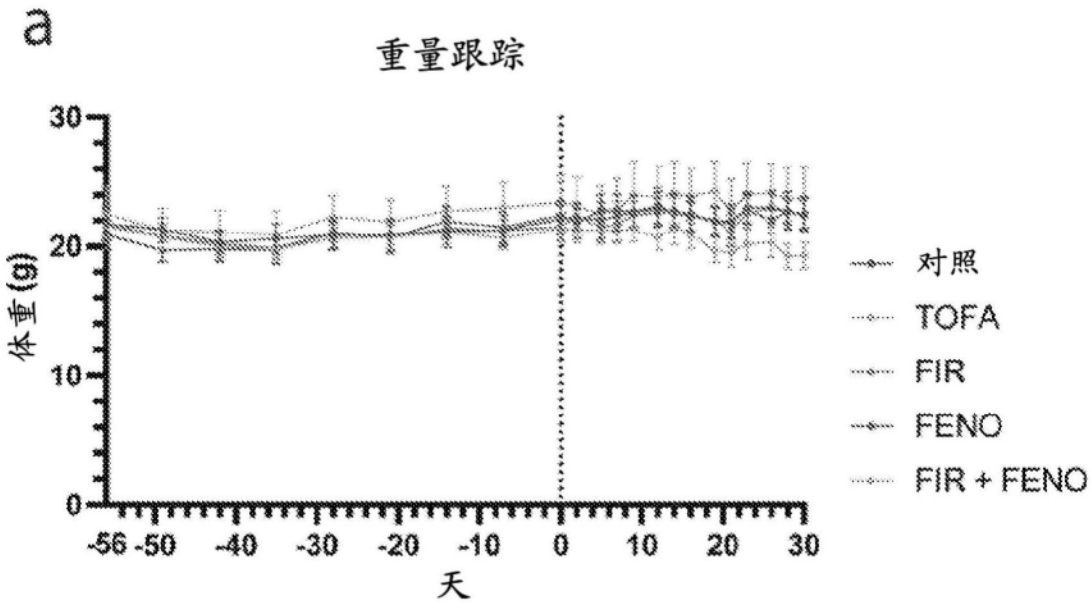

a
重量跟踪
体重(g)
30
20
10
0
-56 -50 -40 -30 -20 -10 0 10 20 30
天
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO

图9A

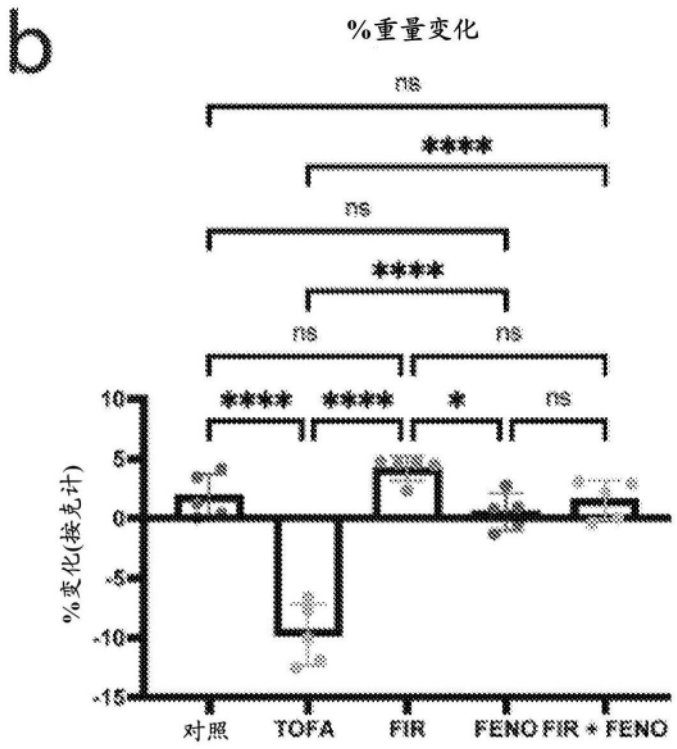

b
%重量变化
ns
****
ns
****
ns
ns
****
****
*
ns
%变化(按克计)
10
5
0
-5
-10
-15
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO

图9B

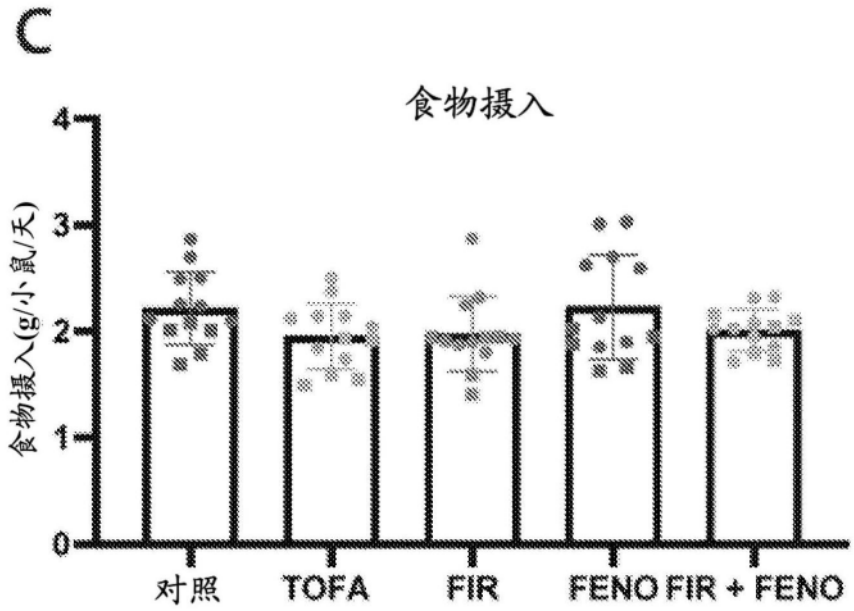

C
食物摄入
食物摄入(g/小鼠/天)
0
1
2
3
4
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO

图9C

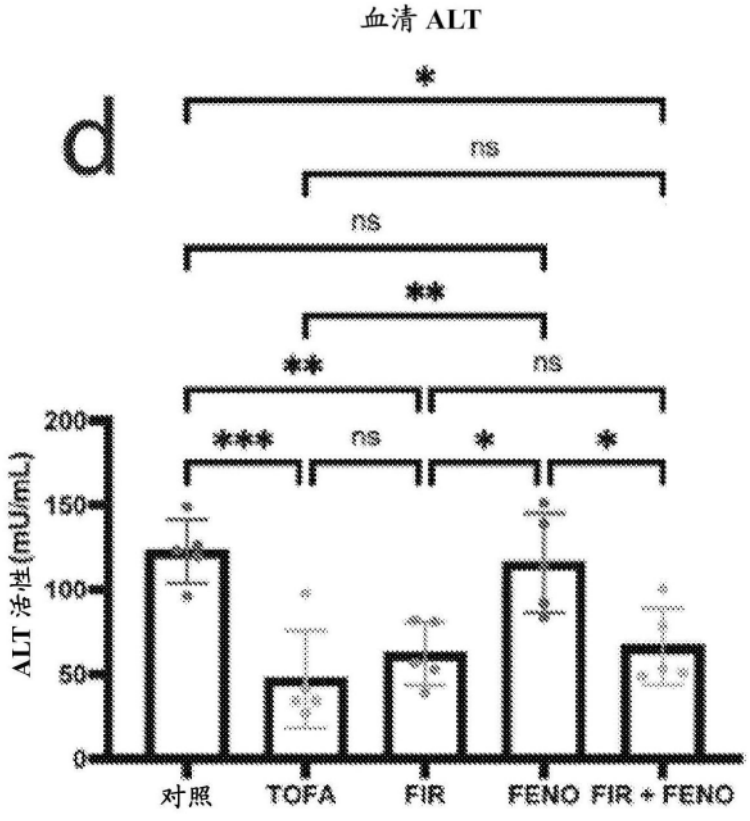

血清 ALT
d
*
ns
ns
**
**
ns
***
ns
*
*
ALT 活性(mU/mL)
0
50
100
150
200
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO

图9D

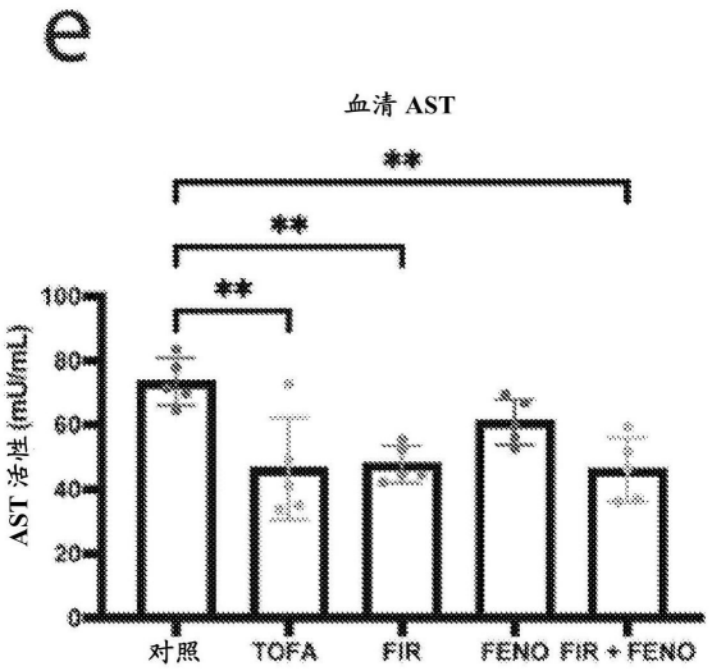

e
血清 AST
**
**
**
AST 活性 (mU/mL)
100
80
60
40
20
0
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO

图9E

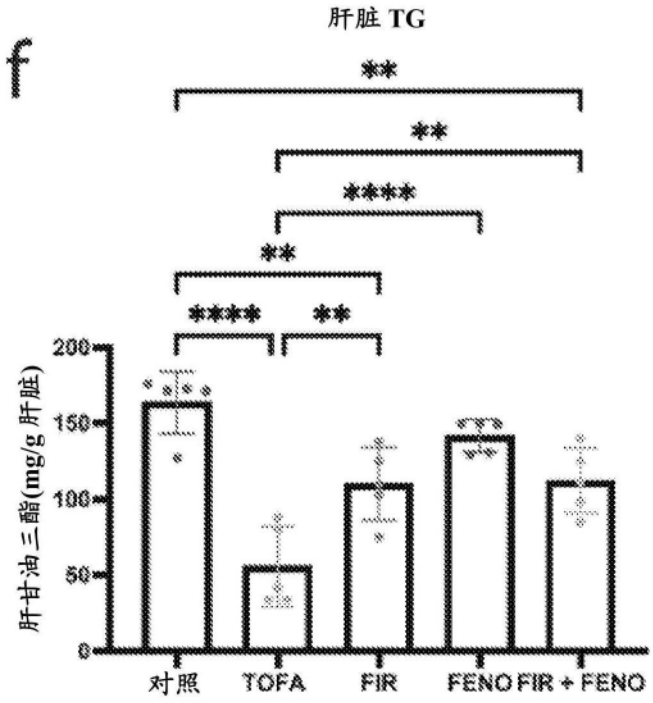

f
肝脏 TG
**
**
****
**
****
**
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
200
150
100
50
0
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO

图9F

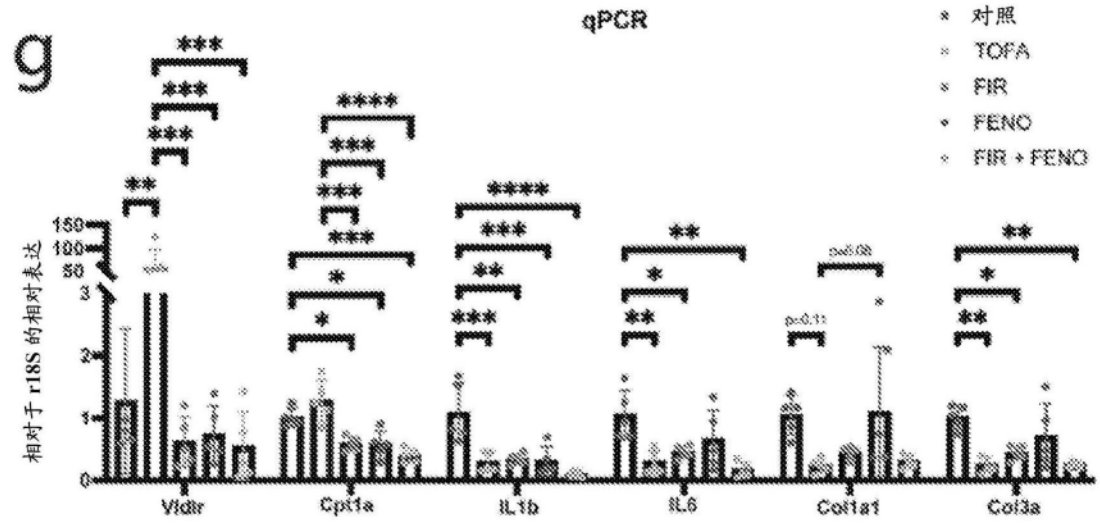

g
qPCR
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO
相对于 r18S 的相对表达
Vldlr
Cpt1a
IL1b
IL6
Col1a1
Col3a

图9G

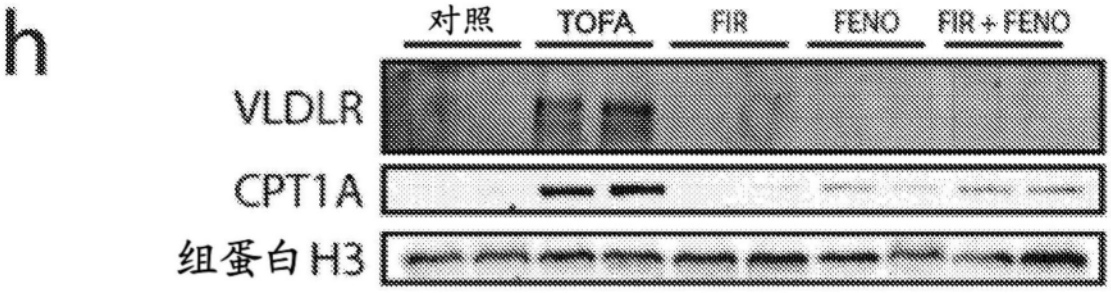

h
对照
TOFA
FIR
FENO
FIR + FENO
VLDLR
CPT1A
组蛋白 H3

图9H

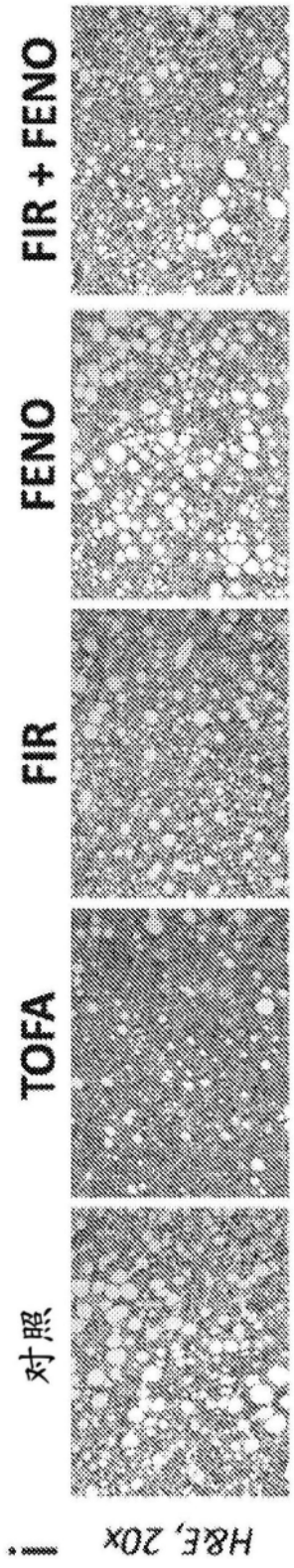



图9I

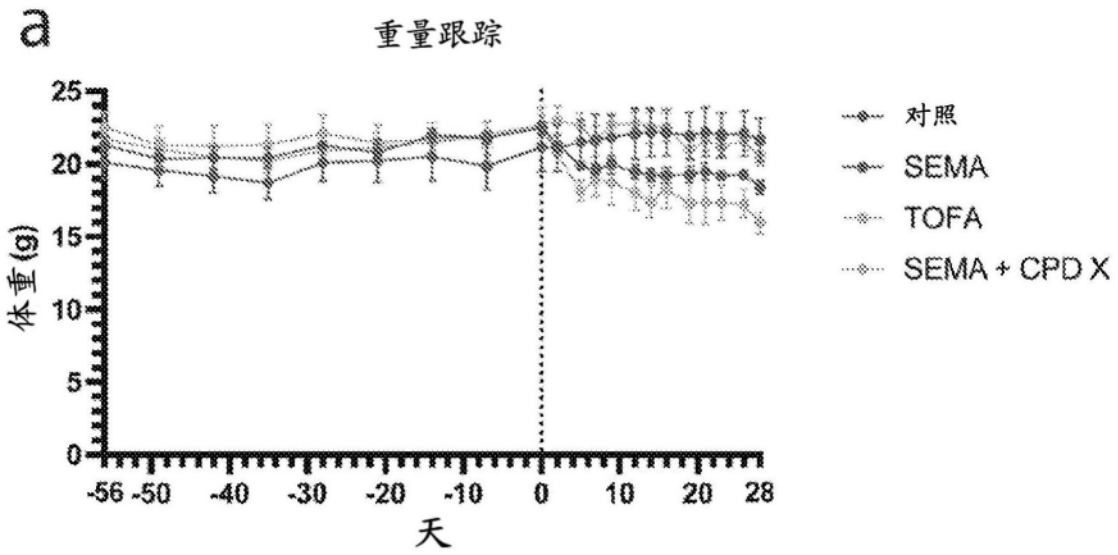

a
重量跟踪
体重(g)
25
20
15
10
5
0
-56 -50 -40 -30 -20 -10 0 10 20 28
天
对照
SEMA
TOFA
SEMA + CPD X

图10A

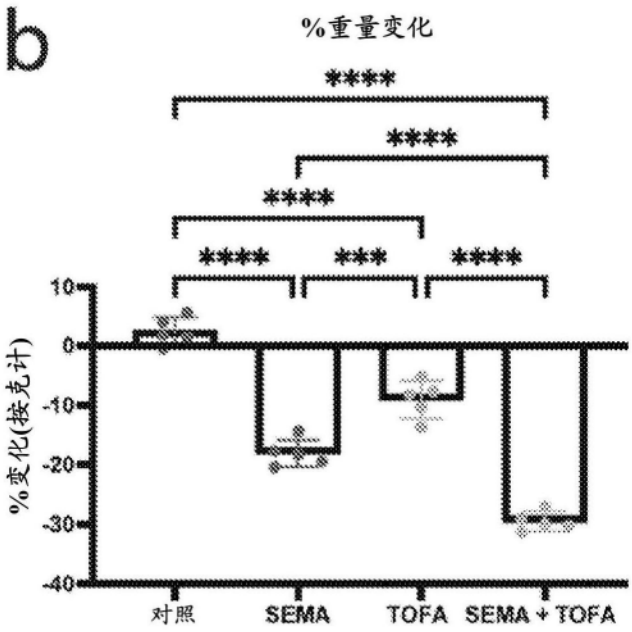

b
%重量变化
****
****
****
****
***
****
%变化(按克计)
10
0
-10
-20
-30
-40
对照
SEMA
TOFA
SEMA + TOFA

图10B

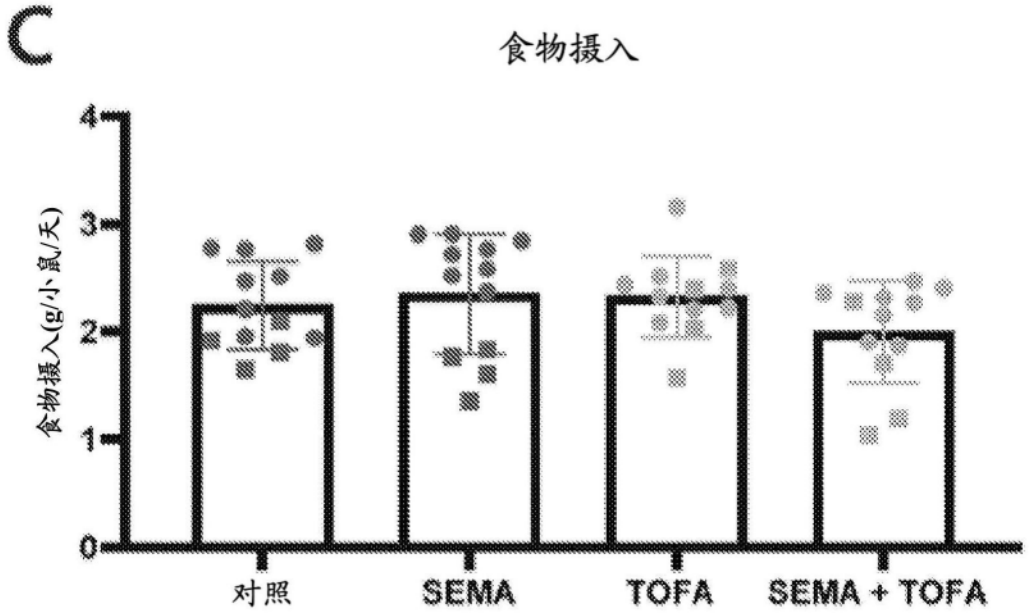

C
食物摄入
食物摄入(g/小鼠/天)
4
3
2
1
0
对照
SEMA
TOFA
SEMA + TOFA

图10C

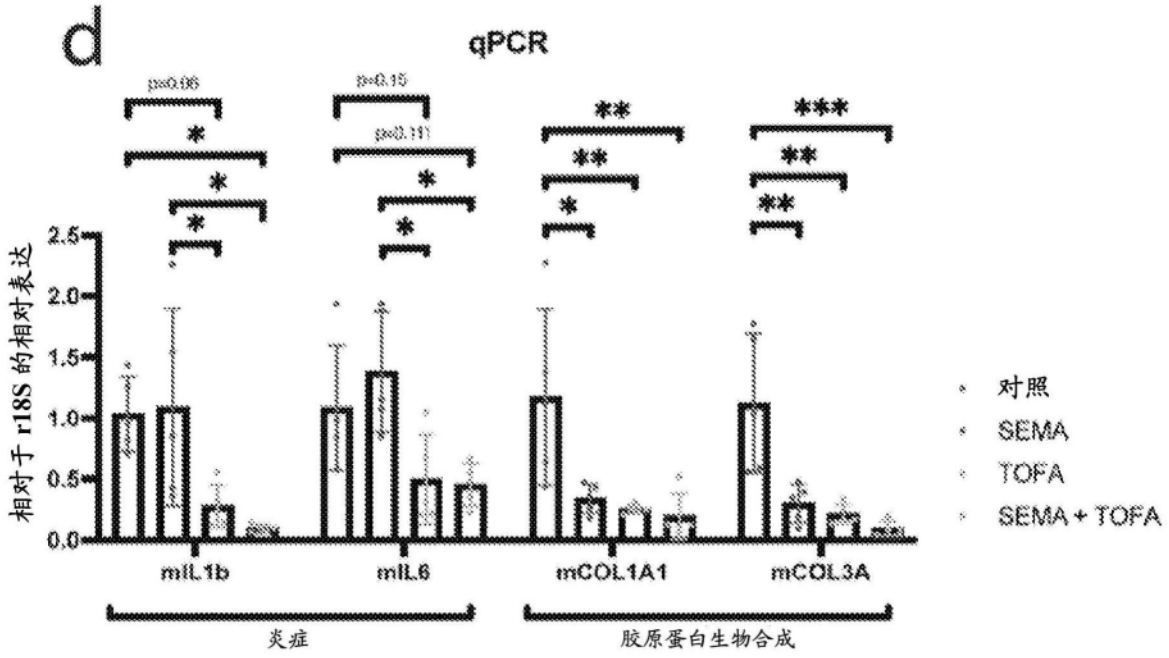

d
qPCR
相对于 r18S 的相对表达
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
mIL1b
mIL6
mCOL1A1
mCOL3A
炎症
胶原蛋白生物合成
对照
SEMA
TOFA
SEMA + TOFA

图10D

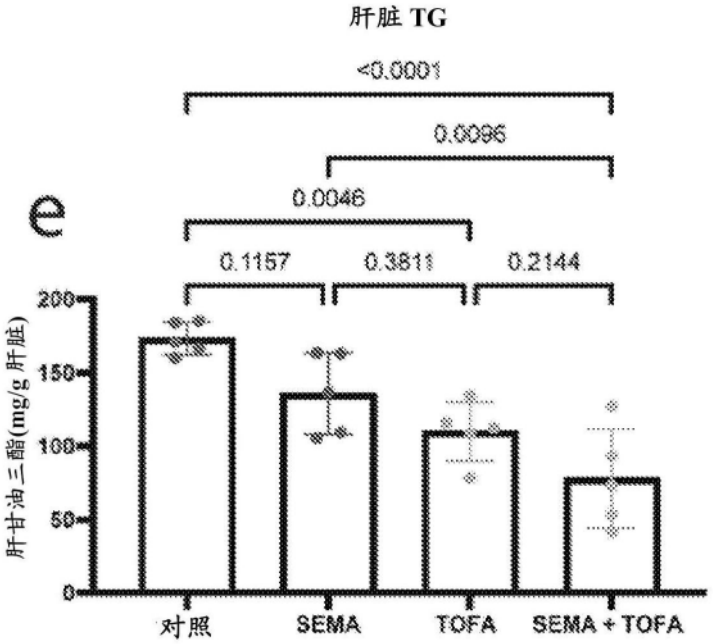

肝脏 TG
e
<0.0001
0.0096
0.0046
0.1157
0.3811
0.2144
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
200
150
100
50
0
对照
SEMA
TOFA
SEMA + TOFA

图10E

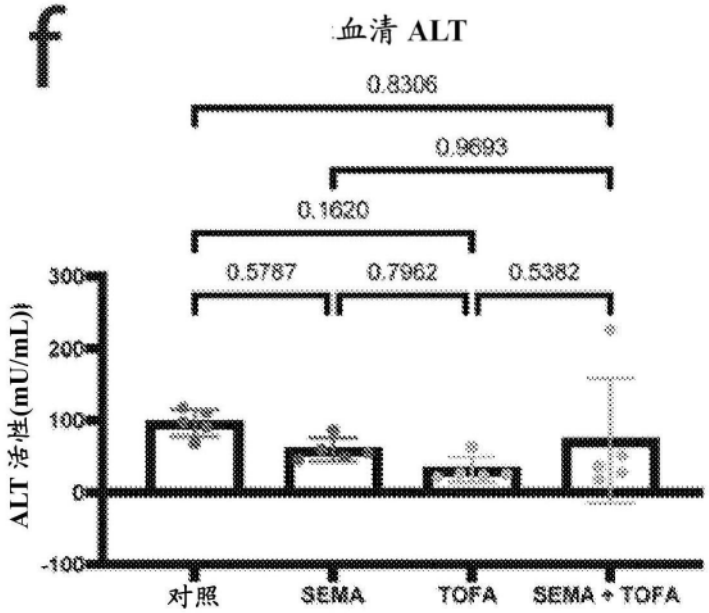

f
血清 ALT
0.8306
0.9693
0.1620
0.5787
0.7962
0.5382
ALT 活性(mU/mL)
300
200
100
0
-100
对照
SEMA
TOFA
SEMA + TOFA

图10F

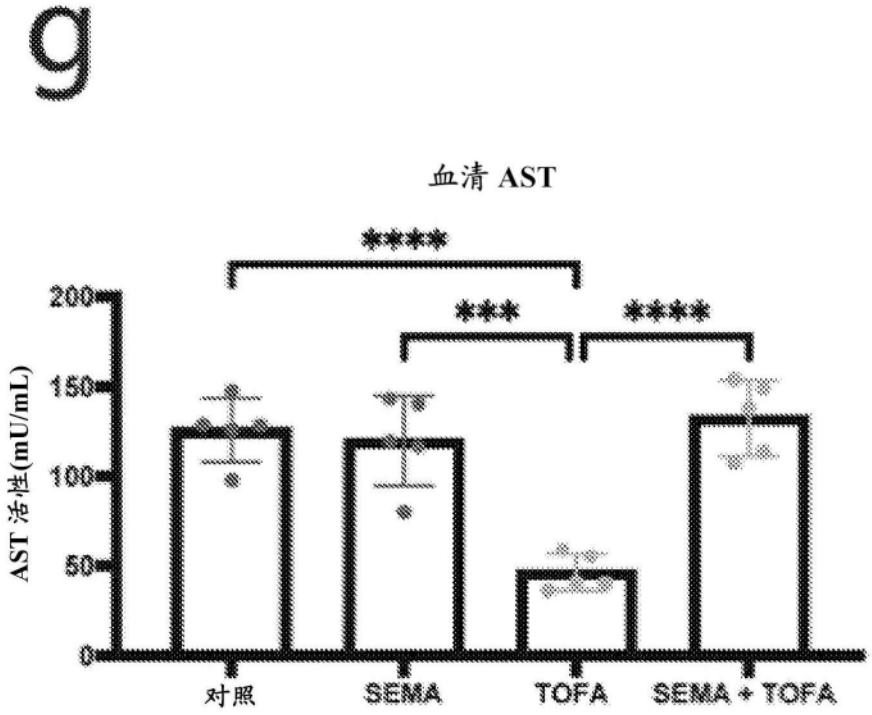

g
血清 AST
****
***
****
AST 活性(mU/mL)
200
150
100
50
0
对照
SEMA
TOFA
SEMA + TOFA

图10G

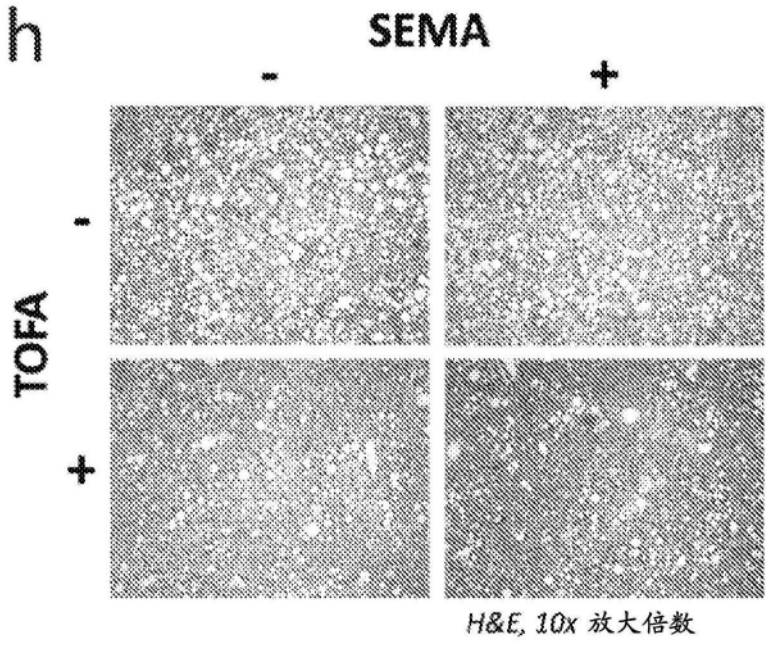

h
SEMA
-
+
TOFA
-
+
H&E, 10x 放大倍数

图10H

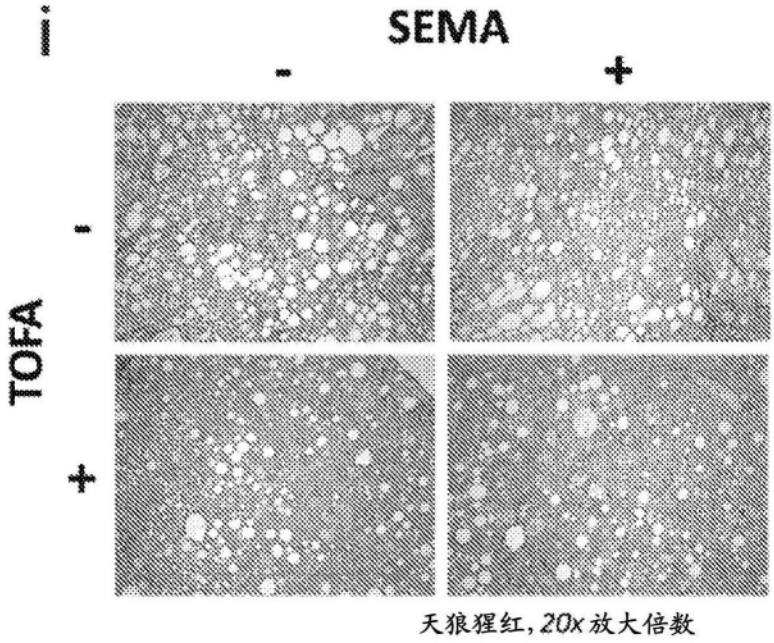

i
SEMA
-
+
TOFA
-
+
天狼猩红,20x 放大倍数

图10I

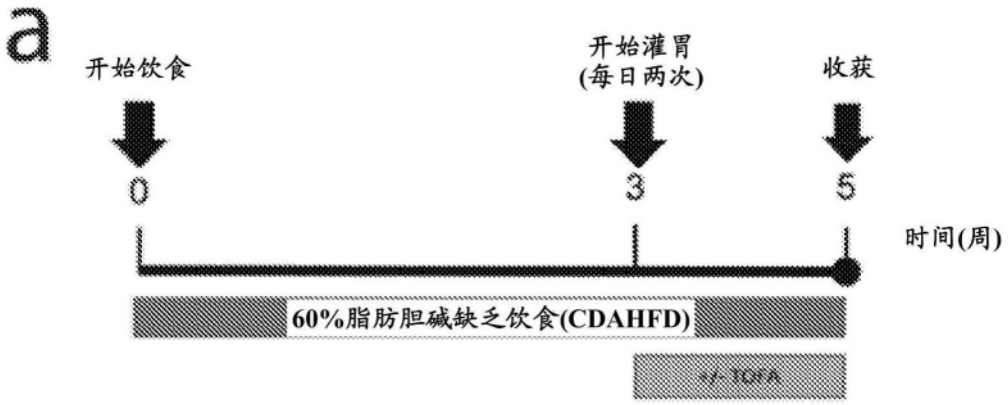

a
开始饮食
开始灌胃
(每日两次)
收获
0
3
5
时间(周)
60%脂肪胆碱缺乏饮食(CDAHFD)
+/- TOFA

图11A

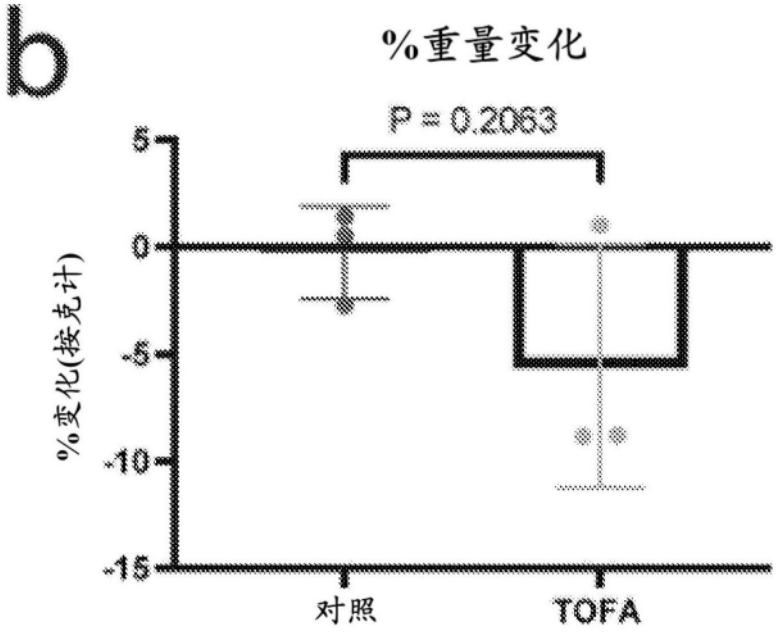

b
%重量变化
P = 0.2063
%变化(按克计)
5
0
-5
-10
-15
对照
TOFA

图11B

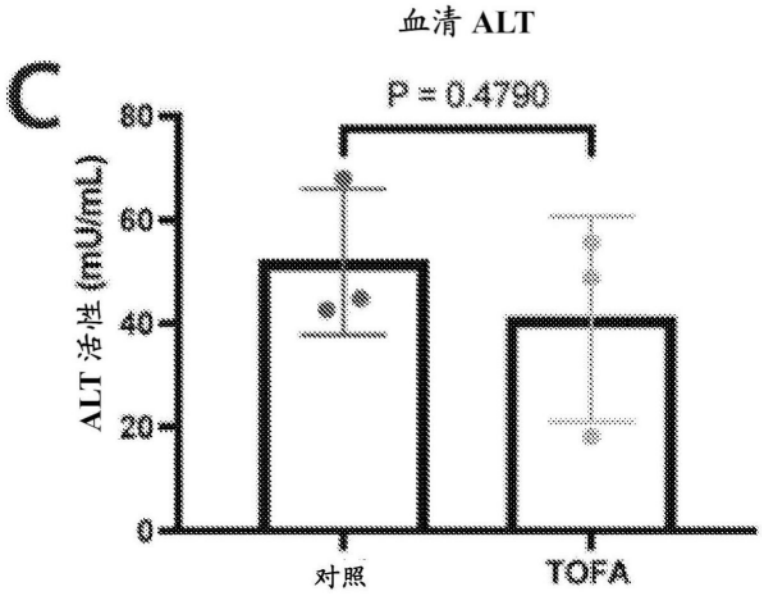

c
血清 ALT
P = 0.4790
ALT 活性 (mU/mL)
80
60
40
20
0
对照
TOFA

图11C

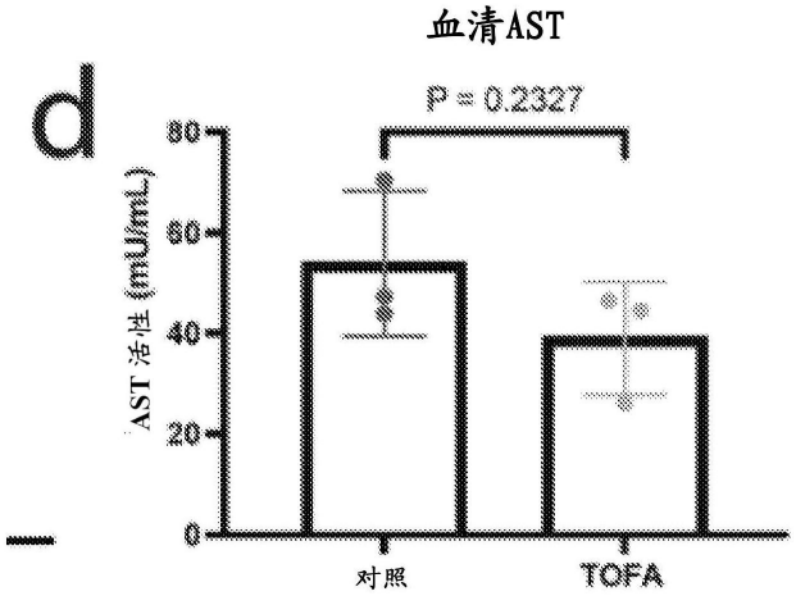

血清AST
d
P = 0.2327
AST 活性 (mU/mL)
80
60
40
20
0
对照
TOFA

图11D

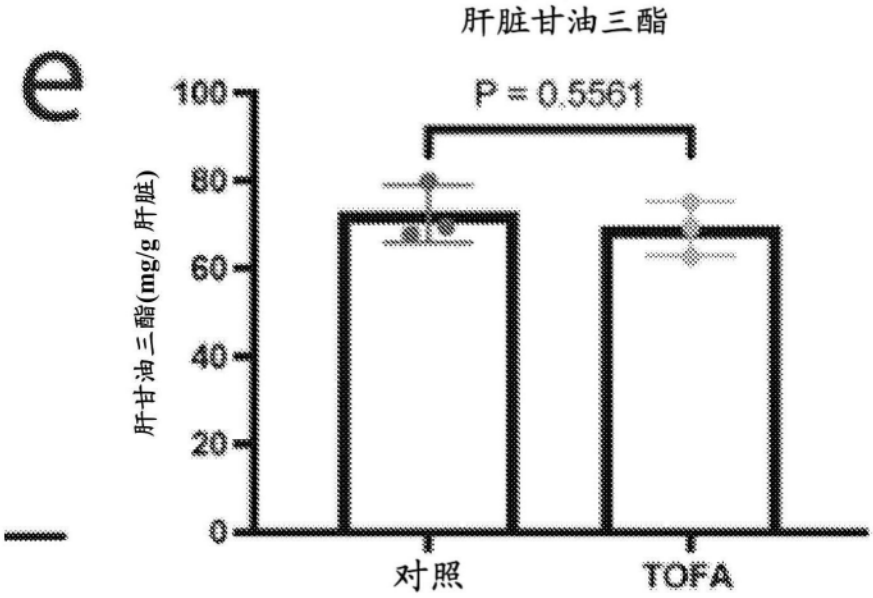

肝脏甘油三酯
e
P = 0.5561
肝甘油三酯(mg/g 肝脏)
100
80
60
40
20
0
对照
TOFA

图11E

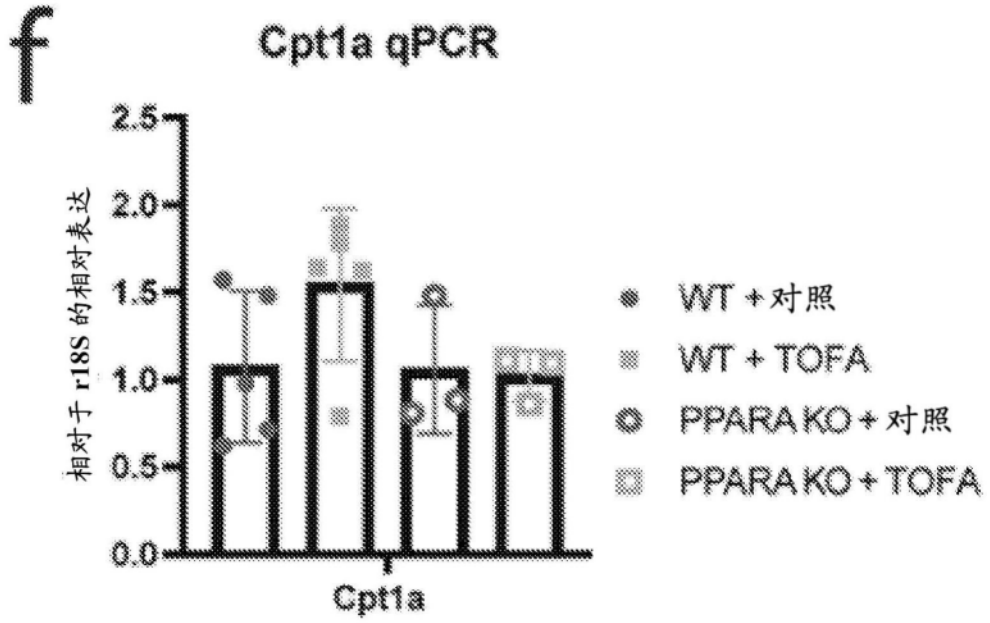

f
Cpt1a qPCR
相对于 r18S 的相对表达
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Cpt1a
WT + 对照
WT + TOFA
PPARA KO + 对照
PPARA KO + TOFA

图11F

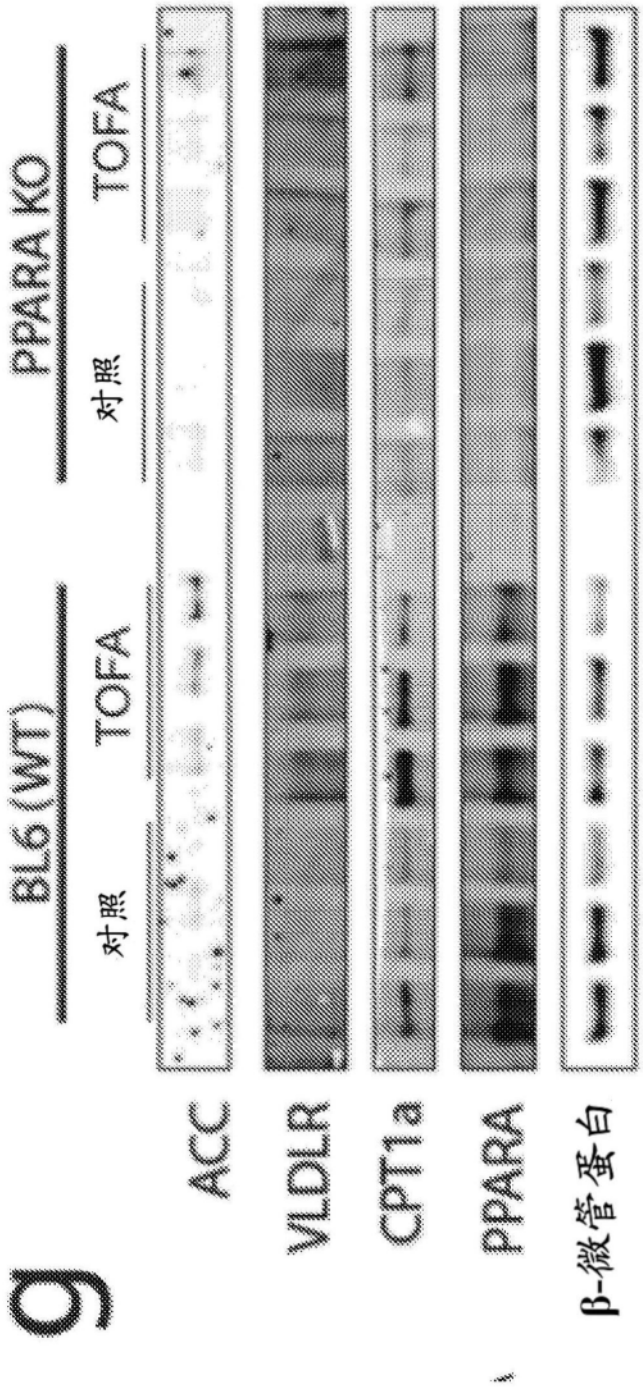



图11G

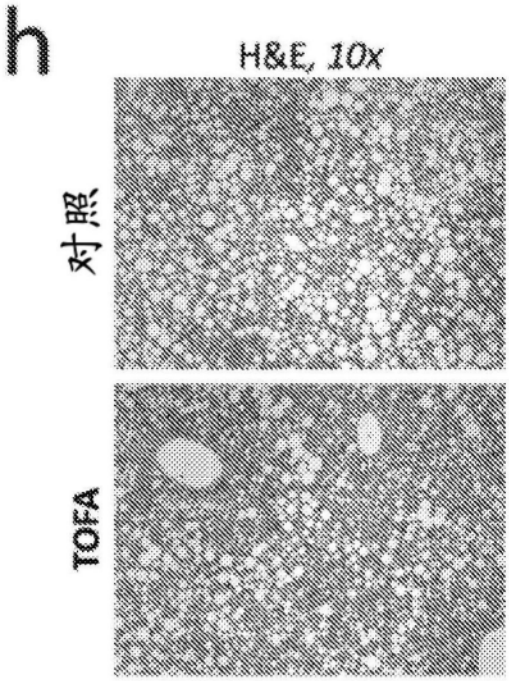



图11H

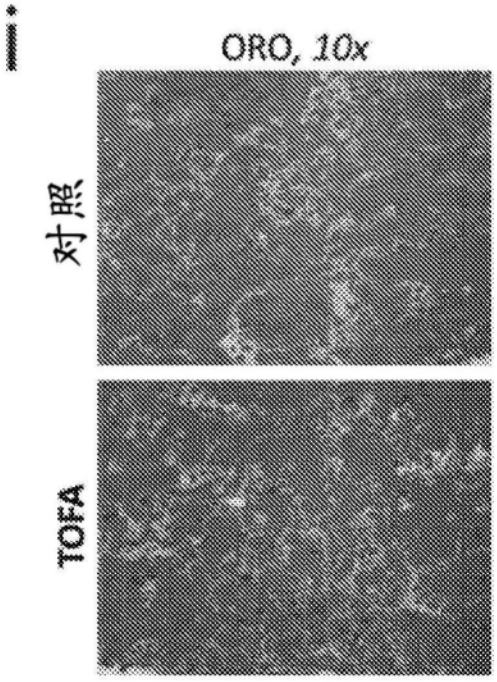



图11I

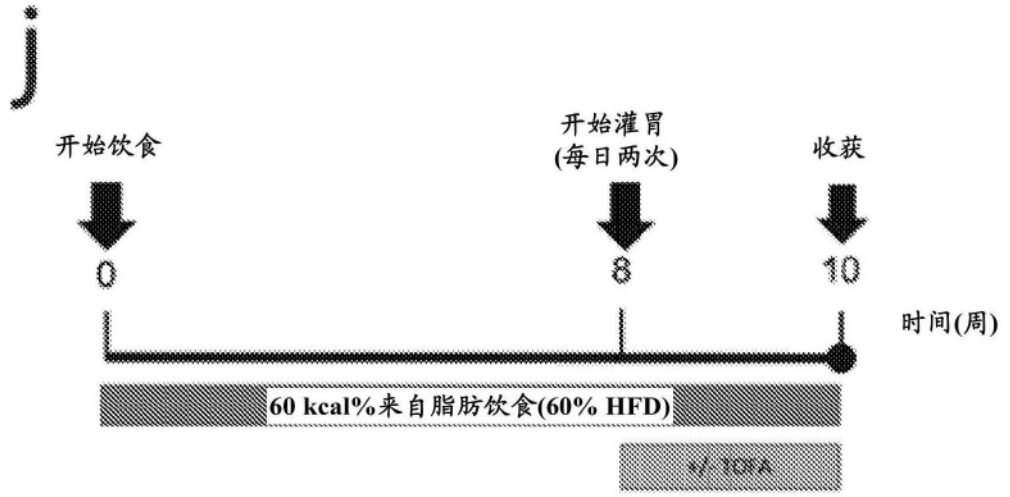

j
开始饮食
开始灌胃
(每日两次)
收获
0
8
10
时间(周)
60 kcal%来自脂肪饮食(60% HFD)
+/- TOFA

图11J

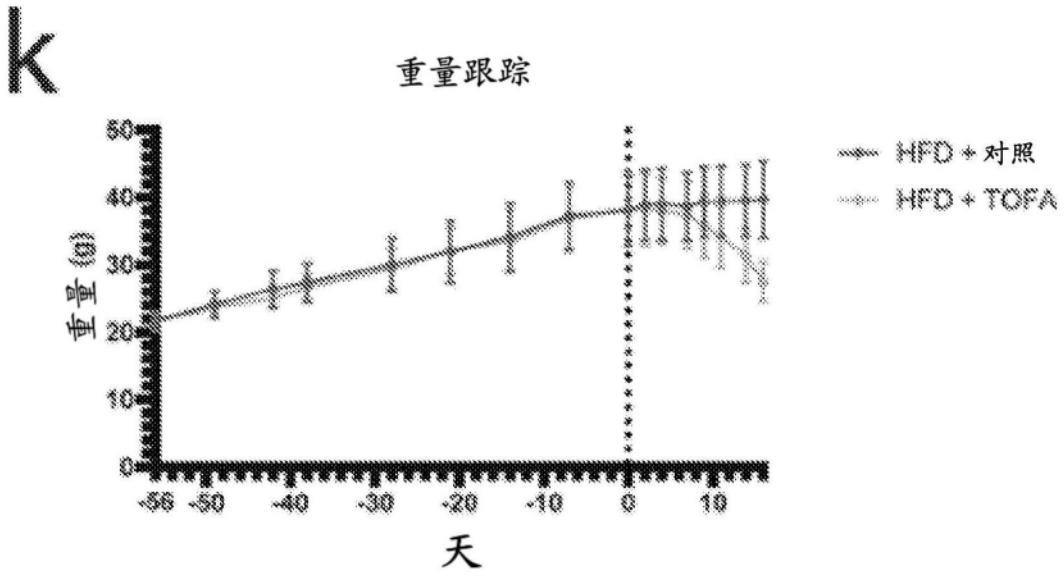

k
重量跟踪
重量 (g)
50
40
30
20
10
0
-56 -50 -40 -30 -20 -10 0 10
天
HFD + 对照
HFD + TOFA

图11K

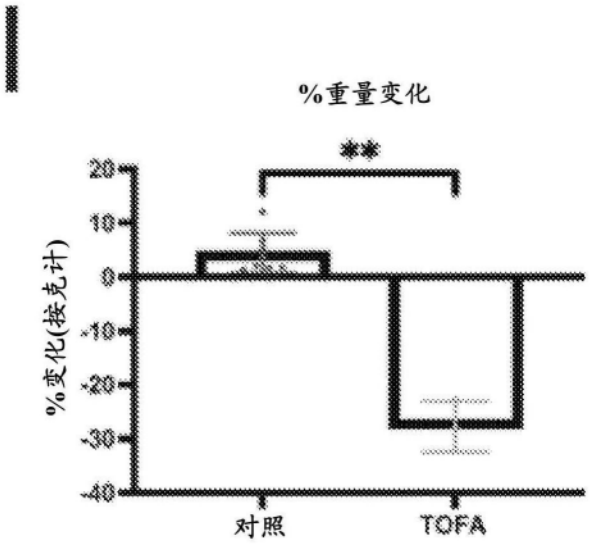

%重量变化
**
%变化(按克计)
20
10
0
-10
-20
-30
-40
对照
TOFA

图11L

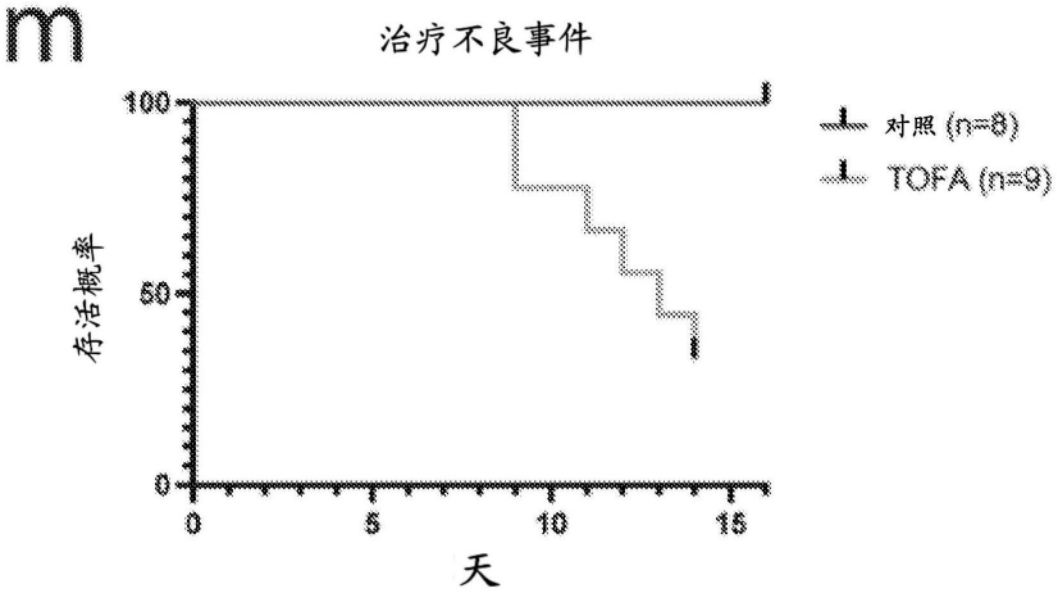

m
治疗不良事件
存活概率
100
50
0
0
5
10
15
天
对照 (n=8)
TOFA (n=9)

图11M

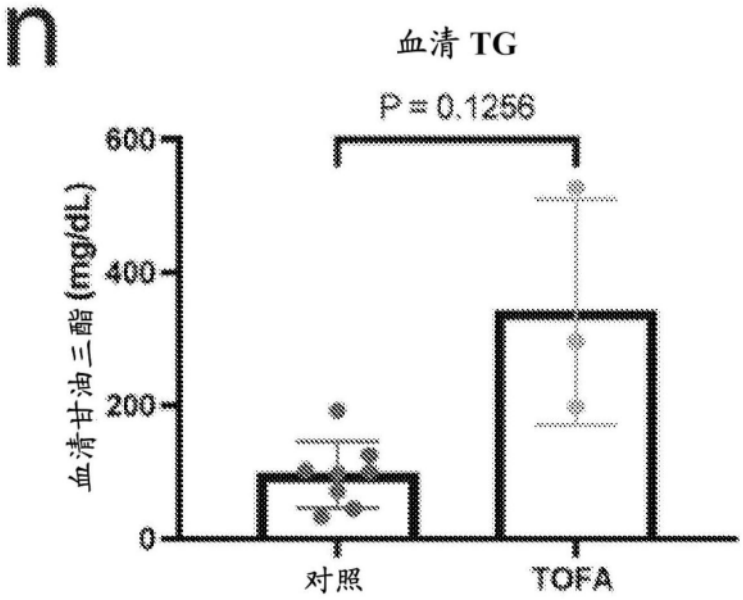

n
血清 TG
P = 0.1256
600
400
200
0
血清甘油三酯 (mg/dL)
对照
TOFA

图11N

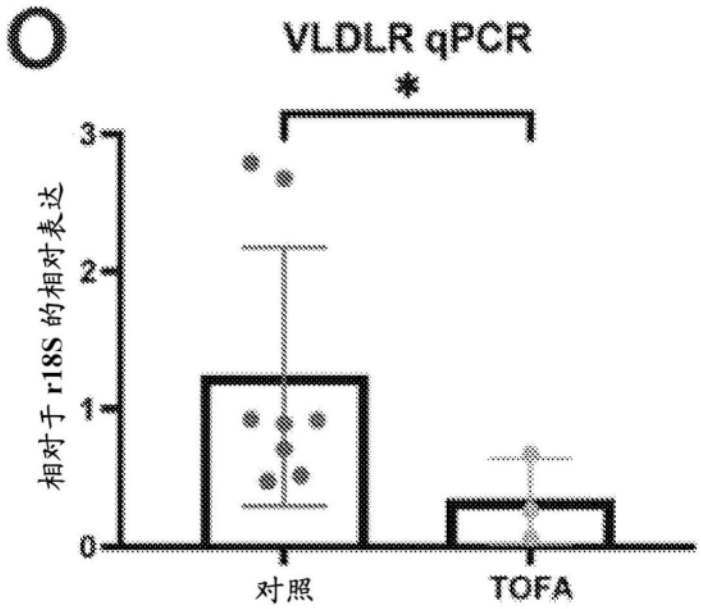

O
VLDLR qPCR
*
3
2
1
0
相对于 r18S 的相对表达
对照
TOFA

图110

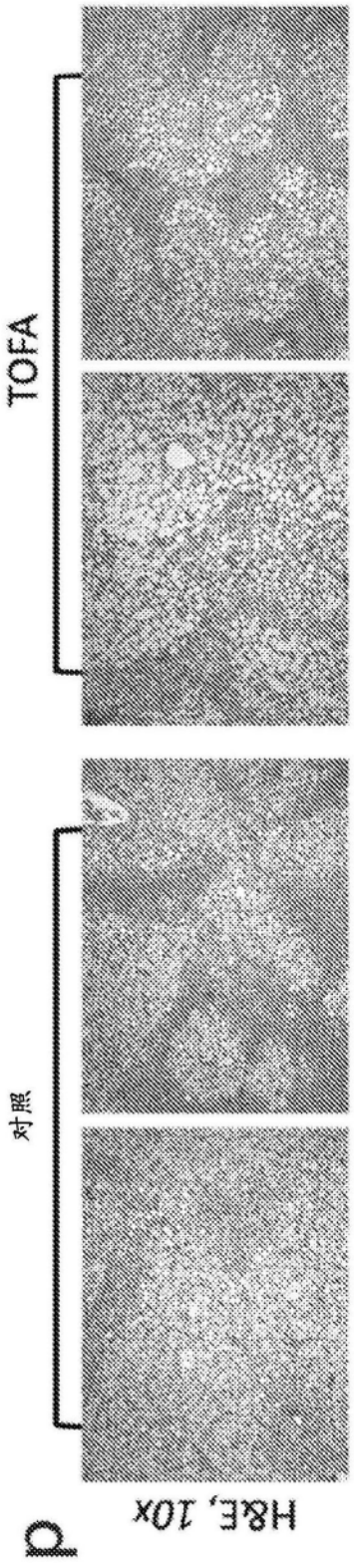



图11P