



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110475554 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 30

(21) 申请号 201880022316.7

(22) 申请日 2018.03.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110475554 A

(43) 申请公布日 2019.11.19

(30) 优先权数据
10-2017-0040139 2017.03.29 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2018/003711 2018.03.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/182329 KO 2018.10.04

(73) 专利权人 蔚山大学校产学协力团
地址 韩国蔚山市
专利权人 财团法人峨山社会福祉财团
国立首尔大学产学协力团

(72) 发明人 高银熙 李起业 金相熙 金大德

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 苗堃 金世煜

(51) Int.Cl.

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A61K 31/4192 (2006.01)

(56) 对比文件

US 20160340321 A, 2016.11.24

Amy S. Mauer等. Inhibition of sphingosine 1-phosphate signaling ameliorates murine nonalcoholic steatohepatitis.《Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol》.2016,第312卷(第3期),第G300-G313页.

Amy S. Mauer等. Inhibition of sphingosine 1-phosphate signaling ameliorates murine nonalcoholic steatohepatitis.《Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol》.2016,第312卷(第3期),第G300-G313页. (续)

审查员 洪梦实

权利要求书1页 说明书12页 附图8页

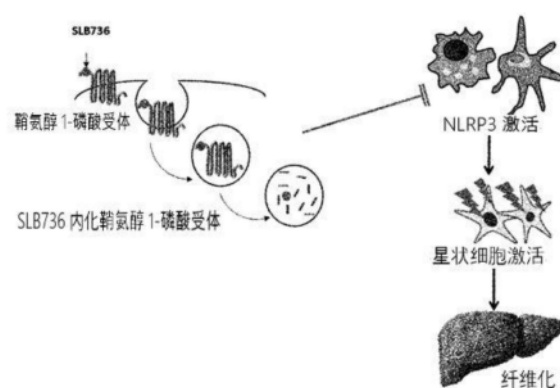
(54) 发明名称

用于预防或治疗靶向鞘氨醇1-磷酸受体4的非酒精性脂肪性肝炎的组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于预防或治疗靶向鞘氨醇1-磷酸受体4(S1PR4)的非酒精性脂肪性肝炎的组合物,更详细地,本发明涉及包含鞘脂化化合物的药学组合物,所述鞘脂化合物通过起到与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的功能抑制剂作用来预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎。本发明的鞘脂化合物具有减少肝组织内的炎症细胞浸润和抑制生成纤维化的效果,并且还减少肝功能(ALT)数值及肝组织炎症、纤维化相关基因的表达,从而期待能够被应用为预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎

(NASH)的有效的先导物质。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

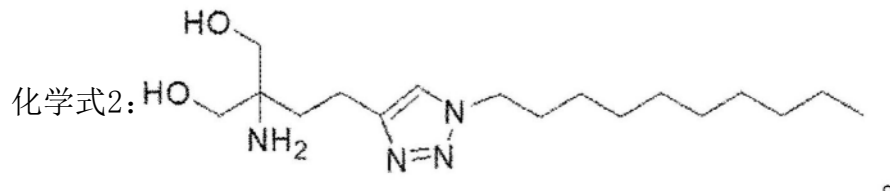
Eric Kwong等.Bile acids and sphingosine-1-phosphate receptor 2 in hepatic lipid metabolism.《Acta Pharmaceutica Sinica B》.2015,第5卷(第2期),第151-157页.

Masaya Sato等.Sphingosine kinase-1, S1P transporter spinster homolog 2 and S1P2 mRNA expressions are increased in liver with advanced fibrosis in human.《Scientific Reports》.2016,第6卷(第32119期),第1-8页.

1. 一种用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的药学组合物, 包含选自下述化合物的化合物或其药学上可接受的盐作为有效成分:

2-氨基-2-(2-(1-辛基-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基)丙烷-1,3-二醇。

2. 一种用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的药学组合物, 包含由下述化学式 2 表示的化合物或其药学上可接受的盐作为有效成分:



用于预防或治疗靶向鞘氨醇1-磷酸受体4的非酒精性脂肪性 肝炎的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于预防或治疗靶向鞘氨醇1-磷酸受体4 (S1PR4) 的非酒精性脂肪性肝炎的组合物,更详细地,本发明涉及包含鞘脂化合物的药学组合物,所述鞘脂化合物通过起到与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的功能抑制剂作用来预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎。

背景技术

[0002] 从冬虫夏草真菌中分离的多球壳菌素 (myriocin) 长期以来以其各种药理作用而闻名,发现具有预想非酒精性脂肪肝疾病 (Non-alcoholic fatty acid liver disease; NAFLD) 发生的效果 (Yang et al., Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 194: 35851, Kurek et al., Liver Int. 2014; 24: 106929, Kasumov et al., PLoS One. 2015; 25: 993337)。但是,由于该物质安全系数 (safety margin) 较低,并且动物实验显示在常规用量的10倍下因严重的消化障碍而死亡,因此未开发成药物。并且,由于包含多球壳菌素的鞘脂 (sphingolipid) 化合物一般对水的溶解度低,因此,到目前为止,被认为作为药物的发展可能性很低。

[0003] 但是,随着由多球壳菌素衍生物开发的FTY720 (Fingolimod) 被批准用于常见于西方年轻人的作为退行性神经系统疾病的复发缓解型多发性硬化症 (relapsing-remitting multiple sclerosis; RRMS) 的适应症,开发鞘脂作为药物的努力正在重新出现。已知所述FTY720为口服药剂,用作表达在淋巴细胞和各种神经细胞的鞘氨醇1-磷酸 (sphingosine 1-phosphate; S1P) 受体的调节剂,从而通过作用于免疫系统来减少病原性淋巴细胞的中枢神经系统的再循环和迁移。

[0004] 另一方面,FTY720非选择性地作用于鞘氨醇1-磷酸受体的亚型 (S1P1、S1P2、S1P3、S1P4及S1P5),导致血液中淋巴细胞减少 (lymphopenia) 或心动过缓及心律失常等以心脏循环系统为中心的严重的副作用,从而可引发问题。因此,需要开发对鞘氨醇1-磷酸受体具有选择性的治疗剂。

[0005] 为此,本发明人致力于开发鞘脂化合物中选择性作用于鞘氨醇1-磷酸亚型受体的独立的化合物的过程中,确认本发明的化合物与存在于巨噬细胞的鞘氨醇1-磷酸4 (S1P4) 受体特异性结果,并起到功能抑制剂 (antagonist) 作用,具有预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis; NASH) 的效果,从而完成了本发明。

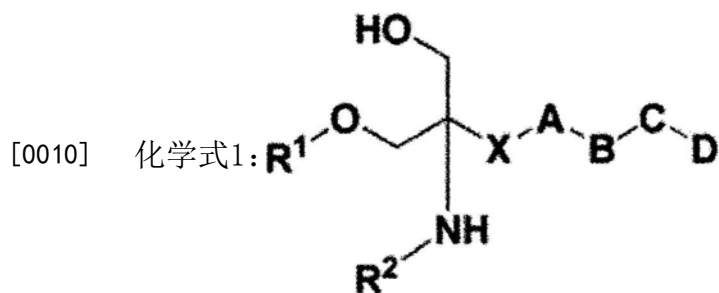
发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的在于,提供一种用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的药学组合物。

[0008] 解决问题的方案

[0009] 本发明为了解决如上所述的问题,本发明提供包含由下述化学式1表示的化合物、其光学异构体或其药学上可接受的盐作为有效成分的用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的药学组合物。



[0011] 在所述化学式1中,



[0013] R^2 为氢、未取代或取代的 C_{1-5} 的直链或支链的烷基羰基,

[0014] 其中,所述取代的烷基羰基是被选自由羟基、卤素、氰基、硝基及氨基组成的组中的一种以上的取代基取代;

[0015] A为包含选自由N、O及S组成的组中的一种以上的杂原子的5元环的杂亚芳基;

[0016] B为 C_{1-11} 的直链或支链亚烷基;

[0017] C为单键或 C_{6-10} 的亚芳基;

[0018] D为-H、或 C_{1-15} 的直链或支链烷基;以及

[0019] X为单键、 C_{1-5} 的亚烷基、 C_{2-5} 的亚烯基或 C_{2-5} 的亚炔基。

[0020] 优选地,



[0022] R^2 为氢、 C_{1-3} 的直链或支链的烷基羰基;

[0023] A为包含选自由N、O及S组成的组中的一种以上的杂原子的5元环的杂亚芳基;

[0024] B为 C_{1-9} 的直链或支链亚烷基;

[0025] C为单键或 C_{6-10} 的亚芳基;

[0026] D为-H、或 C_{3-12} 的直链或支链烷基;以及

[0027] X为单键、 C_{1-3} 的亚烷基、 C_{2-3} 的亚烯基或 C_{2-3} 的亚炔基。

[0028] 更优选地,



- [0030] R^2 为氢或乙酰基，
- [0031] A为包含选自N、O及S组成的组中的一种以上的杂原子的5元环的杂亚芳基；
- [0032] B为 C_{2-8} 的亚烷基；
- [0033] C为单键或亚苯基；
- [0034] D为-H、或 C_{6-10} 的直链或支链烷基；以及
- [0035] X为单键、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 或 $-C\equiv C-$ 。
- [0036] 作为本发明的由所述化学式1表示的有效成分的优选的例可列举下述化学式。
- [0037] (1) 2-氨基-2-(2-(3-癸基异恶唑-5-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0038] (2) 2-氨基-2-(2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0039] (3) 2-氨基-2-((3-辛基异恶唑-5-基)乙炔基)丙烷-1,3-二醇；
- [0040] (4) 2-氨基-2-(2-(3-辛基异恶唑-5-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0041] (5) 2-氨基-2-(羟甲基)-4-(3-辛基异恶唑-5-基)磷酸二氢丁酯；
- [0042] (6) 2-氨基-2-((3-癸基异恶唑-5-基)乙炔基)丙烷-1,3-二醇；
- [0043] (7) 2-氨基-4-(3-癸基异恶唑-5-基)-2-(羟甲基)磷酸二氢丁酯；
- [0044] (8) 2-氨基-2-(2-(3-(4-己基苯乙基)异恶唑-5-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0045] (9) 2-氨基-2-((3-十二烷基异恶唑-5-基)乙炔基)丙烷-1,3-二醇；
- [0046] (10) 2-氨基-2-(2-(3-十二烷基异恶唑-5-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0047] (11) 2-氨基-4-(3-十二烷基异恶唑-5-基)-2-(羟甲基)磷酸二氢丁酯；
- [0048] (12) 2-氨基-2-(2-(1-辛基-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙炔基)丙烷-1,3-二醇；
- [0049] (13) 2-氨基-2-(2-(1-辛基-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0050] (14) 2-氨基-2-((1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙炔基)丙烷-1,3-二醇；
- [0051] (15) 2-氨基-2-(2-(1-(4-己基苯乙基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0052] (16) 2-氨基-2-(1-丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇；
- [0053] (17) 2-氨基-2-(3-十二烷基异恶唑-5-基)丙烷-1,3-二醇；
- [0054] (18) (E)-2-氨基-2-(2-(3-癸基异恶唑-5-基)乙烯基)丙烷-1,3-二醇；
- [0055] (19) (E)-2-氨基-2-(1-丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙烷-1,3-二醇；
- [0056] (20) 2-氨基-2-(2-(3-(8-苯基辛基)-异恶唑-5-基)乙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0057] (21) 2-氨基-2-(2-(1-(8-苯基辛基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙基)丙烷-1,3-二醇；
- [0058] (22) N-(2-(1-十二烷基-1H-1,2,3-三唑-4-基)-1,3-二羟基丙烷-2-基)乙酰胺；
- [0059] (23) N-(2-(3-十二烷基异恶唑-5-基)-1,3-二羟基丙烷-2-基)乙酰胺；
- [0060] (24) N-(4-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)-1-羟基-2-(羟甲基)丁烷-2-基)乙酰胺；
- [0061] (25) N-(4-(3-癸基异恶唑-5-基)-1-羟基-2-(羟甲基)丁烷-2-基)乙酰胺；以及
- [0062] (26) N-(4-(1-(4-己基苯乙基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)-1-羟基-2-(羟甲基)丁烷-2-基)乙酰胺。
- [0063] 在下述表1中示出所述(1)至(26)的化学式结构。
- [0064] 表1

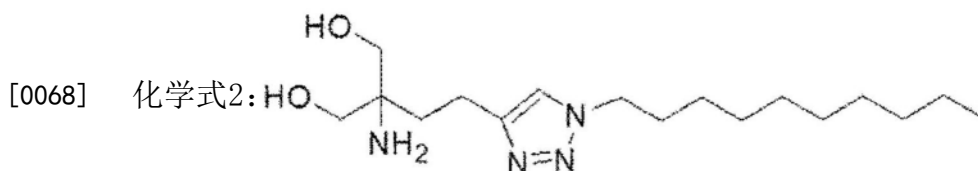
[0065]

No	化学结构	No	化学结构
(1)		(14)	
(2)		(15)	
(3)		(16)	
(4)		(17)	
(5)		(18)	
(6)		(19)	

[0066]

(7)		(20)	
(8)		(21)	
(9)		(22)	
(10)		(23)	
(11)		(24)	
(12)		(25)	
(13)		(26)	

[0067] 更加优选地,本发明的有效成分可以是作为由下述化学式2表示的化合物的2-氨基-2-(2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基)丙烷-1,3-二醇。以下,在发明的详细说明中用SLB736表示由下述化学式2表示的化合物。



[0069] 本发明的由化学式1表示的化合物可以以药学上可接受的盐的形式使用,作为盐,由药学上可接受的游离酸(free acid)形成的酸加成盐是有用的。酸加成盐获自无机酸类,如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚硝酸、亚磷酸等;无毒性有机酸,如脂肪族单羧酸及脂肪族二羧酸、苯基取代的链烷酸酯、羟基链烷酸酯及烷烃二酸酯、芳香族酸类、脂肪族磺酸类及芳香族磺酸类等;有机酸,如乙酸、苯甲酸、柠檬酸、乳酸、马来酸、葡萄糖酸、甲磺酸、4-甲苯磺酸、酒石酸、富马酸。这些药学上无毒的盐的种类包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、硝酸盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐氯化物、溴化物、碘化物、氟化物、醋酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己烷-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二甲酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、氯苯磺酸盐、二甲苯磺酸盐、乙酸苯酯、丙酸苯酯、丁酸苯酯、柠檬酸盐、乳酸盐、β-羟丁酸盐、乙醇酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、甲烷磺酸盐、丙烷磺酸盐、萘-1-磺酸、萘-2-磺酸、扁桃酸盐等。

[0070] 本发明的酸加成盐可通过常规的方法制备,例如,将化学式1的衍生物溶解于有机溶剂如甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、乙腈,加入有机酸或无机酸并过滤、干燥所生成的沉淀物来制备本发明的酸加成盐,加压蒸馏溶液和过量的酸后进行干燥,并在有机溶剂下可通过结晶化来制备本发明的酸加成盐。

[0071] 并且,可通过使用碱基来制备药学上可接受的金属盐。例如,将化合物溶解于过量的碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物溶液中,过滤未溶解化合物盐,蒸发并干燥滤液来获得碱金属或碱土金属盐。此时,作为金属盐,在药学上适合制备钠盐、钾盐或钙盐。并且,将碱金属或碱土金属盐与适当的银盐(例,硝酸银)反应获得相应的盐。

[0072] 进一步地,本发明不仅包含由所述化学式1表示的化合物及其药学上可接受的盐,而且包含能够由此制备的所有溶剂化物、光学异构体、水合物等。

[0073] 使用于本发明的术语“预防”是指通过向个体给药本发明的所述药学组合物来抑制或延迟非酒精性脂肪性肝炎的发病的所有行为。

[0074] 使用于本发明的术语“治疗”是指通过向个体给药本发明的所述药学组合物来使非酒精性脂肪性肝炎的症状好转或有益的所有行为。

[0075] 本发明的特征在于,所述有效成分与鞘氨醇1-磷酸受体4(sphingosine 1-phosphate receptor4, S1PR4)特异性结合后,通过在细胞中使其缺失来抑制鞘氨醇1-磷酸受体4的活性。

[0076] 并且,本发明的特征在于,所述有效成分抑制炎性小体(inflammasome)活性。

[0077] 并且,本发明的特征在于,所述有效成分抑制巨噬细胞的IL-β生成。

[0078] 具体地,如图1所示,本发明的化合物通过与巨噬细胞的鞘氨醇1-磷酸受体4特异性结合后将鞘氨醇1-磷酸受体4引入并消除到细胞中的机制,用作该受体的功能性抑制剂

(functional antagonist),从而抑制NLRP3炎性小体(NLRP3 inflammasome)活性,由此可预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎。

[0079] 本发明的所述药学组合物可包含药学上可接受的载体。在本发明中,所述“药学上可接受的”是指药学领域中常用的,在施用时不刺激生物体并不会抑制所施用的化合物的生物活性及特性。

[0080] 在本发明中,所述载体的种类并不受限制,可以使用任何载体,只要是本技术领域通常所施用的载体即可。作为所述载体的非限制性例,可列举食盐水、灭菌水、林格氏溶液、缓冲食盐水、白蛋白注射液、乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、麦芽糖糊精、甘油、乙醇等。这些可单独使用或混合两种以上来使用。

[0081] 并且,必要时,本发明的所述药学组合物可通过添加其他药学上可接受的添加剂如赋形剂、稀释剂、抗氧化剂、缓冲剂或抑菌剂等来使用,可进一步添加填充剂、增量剂、润湿剂、崩解剂、分散剂、表面活性剂、结合剂或润滑剂等来使用。

[0082] 本发明的所述药学组合物可以制剂化成适于口服给药或非口服给药的剂型来使用。作为所述口服给药用制剂的非限制性例,可列举含片(troches)、锭剂(lozenge)、片剂、水溶性悬浮液、油性悬浮液、配制粉末、颗粒、乳液、硬胶囊、软胶囊、糖浆或酏剂等。

[0083] 为了将本发明的所述药学组合物制剂化成口服给药用,可使用结合剂,如乳糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、支链淀粉(Amylopectin)、纤维素(Cellulose)或明胶(Gelatin)等;赋形剂,如磷酸二钙(Dicalcium phosphate)等;崩解剂,如玉米淀粉或红薯淀粉等;润滑剂,如硬脂酸镁(Magnesium stearate)、硬脂酸钙(Calcium stearate)、硬脂酰富马酸钠(Sodium stearyl fumarate)或聚乙二醇蜡(Polyethylene glycol wax)等,还可使用甜味剂、芳香剂、糖浆等。

[0084] 进一步地,在胶囊剂的情况下,除了所述提及的物质之外,还可使用液体载体,如脂肪油。

[0085] 作为所述非口服用制剂的非限制性例,可列举注射剂、栓剂、呼吸吸入粉末、喷雾用气雾剂、软膏涂敷用粉末、油、膏等。

[0086] 为了将本发明的所述药学组合物制剂化成非口服给药用,可使用无菌水溶液、非水溶剂、悬浮剂、乳剂、冷冻干燥制剂、外用制剂等,所述非水溶剂、悬浮剂可使用植物性油,如丙二醇、聚乙二醇、橄榄油等;可注射的酯,如油酸乙酯。

[0087] 并且,更具体地,在将本发明的所述药学组合物制剂化成注射液的情况下,通过在水中与稳定剂或缓冲剂一起混合本发明的所述组合物来制备成溶液或悬浮液,并且可制剂化成用于安瓿(ampoule)或小瓶(vial)的单位给药。并且,在将本发明的所述药学组合物制剂化成气雾剂的情况下,可以将推进剂等与添加剂一起配制,以分散水分散的浓缩物或湿粉末。

[0088] 并且,在将本发明的所述药学组合物制剂化成软膏、膏等的情况下,可通过使用动物性油、植物性油、蜡、石蜡、淀粉、胶黄树胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅、膨润土、二氧化硅、滑石、氧化锌等作为载体来进行制剂化。

[0089] 本发明的所述药学组合物的药学有效量、有效给药量可根据所述药学组合物的制剂化方法、给药方式、给药时间和/或给药途径等而不同,并且可根据包括通过施用所述药学组合物来实现的反应种类和程度、成为施用对象的个体的种类、年龄、体重、一般健康状

况、疾病的症状或程度、性别、饮食、排泄、对相应个体同时或异时使用的药物其他组合物的成分在内的各种因素和医药领域中公知的类似因素而不同,本技术领域的普通技术人员可以容易地确定和开除对所需治疗有效的剂量。

[0090] 用于本发明的所述药学组合物的更优选的效果的的剂量,优选地,每天0.1mg/kg至1000mg/kg,更优选地,可以为10mg/kg至500mg/kg。可以每天施用一次本发明的所述药学组合物,也可以分几次来施用。因此,所述剂量在任何方面都不限制本发明的范围。

[0091] 本发明的所述药学组合物的给药途径及给药方式可以彼此独立,并且其方式并不受限制,只要所述药学组合物能够达到所需的目的部位,就可根据任何给药途径及给药方式施用。可通过口服或非口服给药方式施用所述药学组合物。

[0092] 作为所述非口服给药方法,例如,可利用静脉内给药、肌肉内给药、经皮给药或皮下给药等,还可利用将所述组合物涂敷、喷雾、吸附在疾病部位的方法,但并不限于此。

[0093] 本发明还提供包含与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的功能抑制剂作为有效成分的用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的药学组合物。

[0094] 在本发明的一实施例中,除了本发明的鞘脂化合物之外,确认通过鞘氨醇1-磷酸受体4短发夹核糖核酸(shRNA)的鞘氨醇1-磷酸受体4表达抑制具有降低巨噬细胞系中白细胞介素-1 β 生成效果并可预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎发病。为此,本发明的与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的功能抑制剂不仅是用作包含本发明的鞘脂化合物的与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的功能抑制剂的化合物,还可以为抑制鞘氨醇1-磷酸受体4蛋白质的活性的与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的抗体、抑制鞘氨醇1-磷酸受体4表达的与鞘氨醇1-磷酸受体4的信使核糖核酸(mRNA)有关的反义核苷酸、适体、小干扰核糖核酸(siRNA)、短发夹核糖核酸,微小核糖核酸(miRNA)及核糖核酸干扰(RNAi)等。在本发明中,与所述鞘氨醇1-磷酸受体4有关的抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0095] 本发明还提供用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的方法,包括向个体给药包含由所述化学式1表示的化合物、其光学异构体或其药学上可接受的盐作为有效成分的组合物步骤。

[0096] 本发明还提供包含由所述化学式1表示的化合物、其光学异构体或其药学上可接受的盐作为有效成分的用于预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的组合物用途。

[0097] 发明效果

[0098] 本发明的鞘脂化合物具有减少肝组织中的脂质沉积、减少炎症细胞浸润、抑制发生纤维化的效果,并且还减少肝功能数值及干组织炎症、纤维化相关基因的表达,从而期待能够被应用为预防或治疗非酒精性脂肪性肝炎的有效的先导物质。

附图说明

[0099] 图1为示出本发明的化合物的非酒精性脂肪性肝炎治疗机制的示意图。

[0100] 图2为确认本发明的鞘脂类化合物SLB736的NLRP3炎性小体活性抑制效果的结果。

[0101] 图3为确认本发明的SLB736化合物抑制模型小鼠肝组织中鞘氨醇1-磷酸受体4表达的效果。

[0102] 图4为确认本发明的SLB736化合物抑制模型小鼠巨噬细胞中鞘氨醇1-磷酸受体4表达的效果。

- [0103] 图5为确认本发明的SLB736化合物流入细胞内后不再循环到(recycle)细胞膜。
- [0104] 图6为确认小鼠巨噬细胞中鞘氨醇1-磷酸受体4短发夹核糖核酸的IL- β 生成较少效果的结果。
- [0105] 图7为利用显微镜确认非酒精性脂肪性肝炎诱导模型小鼠的肝组织中SLB736的脂肪症及小叶内炎症(lobular inflammation)生成预防效果的结果。
- [0106] 图8为利用显微镜确认非酒精性脂肪性肝炎诱导模型小鼠的肝组织中SLB736的纤维化预防效果的结果。
- [0107] 图9为利用CRN评分系统测定模型小鼠的肝组织中SLB736的非酒精性脂肪性肝炎预防效果的结果。
- [0108] 图10为确认模型小鼠的肝组织中炎症标记及纤维化标记的表达抑制效果的结果。
- [0109] 图11为确认模型小鼠的肝组织中SLB736的治疗效果的结果(A-脂肪正及小叶内炎症治疗;B-纤维化治疗)。
- [0110] 图12为确认与FTY720给药后相比,SLB736给药后未出现血液内淋巴细胞减少症(lymphopenia)的结果。

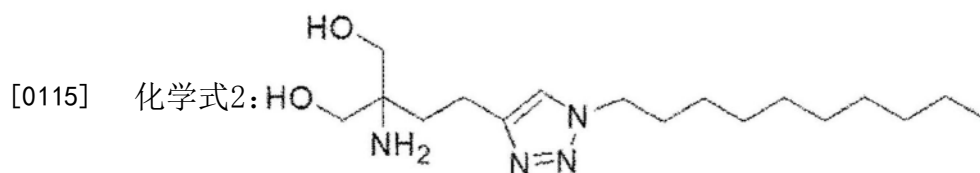
具体实施方式

[0111] 以下,通过实施例进一步详细说明本发明。对本领域技术人员而言,这些实施例仅用于例示本发明,本发明的范围并不限于这些实施例是显而易见的。

[0112] 实施例1.选择鞘脂候选物质

[0113] 为了导出用于非酒精性脂肪性肝炎治疗剂开发的先导候选物质(lead candidate),从鞘脂库所拥有的600多种的鞘脂化合物中,提供了与多球壳菌素(myriocin)及FTY720(fingolimod)结构类似的15种鞘脂化合物。

[0114] 利用DiscoverX公司的GPCR活性测定方法测定与鞘氨醇1-磷酸受体(sphingosine 1-phosphate receptors)有关的激动剂活性(agonistic activity)的结果可确认由下述化学式2表示的2-氨基-2-(2-(1-癸基-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基)丙烷-1,3-二醇(以下,称为SLB736)对鞘氨醇1-磷酸受体4具有特异性激动作用(agonistic effect)。



[0116] 实施例2.NLRP3炎性小体抑制能力

[0117] 众所周知,若对巨噬细胞(Raw cell)处理脂多糖类(lipopolysaccharide;LPS),则具有炎性小体(inflammasome)激活,由此白细胞介素-1 β (IL-1 β)生产增加(Mariathasan et al.,Nat Rev Immunol.2007;17186029)。为了确认作为代表性的炎症介导蛋白质的炎性小体(NLRP3 inflammasome)活性抑制效果,当对巨噬细胞处理脂多糖时,测定候选物质的白细胞介素-1 β 的生成量并进行评价。

[0118] 首先,对作为小鼠巨噬细胞系(cell line)的原始细胞(Raw cell)处理脂多糖(100ng/ml,西格玛奥德里奇(Sigma-aldrich)),12小时后可观察到培养基中的白细胞介素-1 β 的浓度显著增加。

[0119] 作为对照组,对巨噬细胞按浓度处理多球壳菌素(myriocin)的状态下处理相同浓度的脂多糖24小时,确认10 μ M的浓度的多球壳菌素有效降低白细胞介素-1 β 生成,以此为准,进行了确认与其他鞘脂候选物质有关的白细胞介素-1 β 抑制效果的实验。

[0120] 处理已知的作为鞘脂衍生物药物的FTY720的结果可确认在更低于多球壳菌素的浓度的0.1 μ M下具有与10 μ M的多球壳菌素类似的程度的白细胞介素-1 β 生成抑制效果。另一方面,在相同条件下,当处理0.1 μ M或1.0 μ M的由本发明的化学式2表示的化合物SLB736并处理脂多糖时,可确认在各个浓度下,白细胞介素-1 β 生成抑制效果显著优于FTY720(图2)。

[0121] 实施例3. 确认与SLB736的鞘氨醇1-磷酸受体4有关的组织及细胞内表达抑制效果

[0122] 为了确认本发明的化合物SLB736是否起到与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的功能抑制剂作用,向非酒精性脂肪性肝炎模型小鼠及小鼠的巨噬细胞给药候选物质后,确认鞘氨醇1-磷酸受体4蛋白质表达变化。

[0123] 众所周知,若向小鼠给药蛋氨酸胆碱缺乏饮食(methionine choline-deficient diet, MCDD),则会产生非酒精性脂肪性肝炎。将实验对象小鼠(C57BL/6N, Orient Bio, Inc., Korea)分为三组,每组仅喂食蛋氨酸胆碱缺乏饮食、蛋氨酸胆碱缺乏饮食及FTY720、1mg/kg的蛋氨酸胆碱缺乏饮食及1mg/kg的SLB736六周后,通过蛋白质印迹(Western blot)测定小鼠的肝组织中鞘氨醇1-磷酸受体4蛋白质的表达变化。其结果可确认与没有喂食蛋氨酸胆碱缺乏饮食的对照组(con)相比,在仅喂食蛋氨酸胆碱缺乏饮食的小鼠中鞘氨醇1-磷酸受体4表达显著增加,并可确认在与蛋氨酸胆碱缺乏饮食一起给药FTY720或SLB736物质的小鼠中鞘氨醇1-磷酸受体4蛋白质量减少(图3)。

[0124] 并且,对作为小鼠巨噬细胞系的原始细胞处理FTY720或SLB736物质后处理脂多糖,然后测定鞘氨醇1-磷酸受体4表达量。其结果可确认与未经任何处理的对照组(con)相比,仅处理脂多糖的细胞中鞘氨醇1-磷酸受体4的表达显著增加,相反,在同时处理脂多糖和FTY720或SLB736物质的情况下,鞘氨醇1-磷酸受体4的表达量显著减少(图4)。

[0125] 由上可知,本发明的SLB736化合物具有减少鞘氨醇1-磷酸受体4蛋白质的表达量的作用。

[0126] 实施例4. 确认作为与鞘氨醇1-磷酸受体4有关的功能抑制剂的活性

[0127] 为了确认SLB736及FTY720物质是否实际上通过将鞘氨醇1-磷酸受体4内化(internalization)到细胞中来起到功能抑制剂(functional antagonist)作用,使用了过表达鞘氨醇1-磷酸受体4-增强绿色荧光蛋白(S1PR4-EGFP)的细胞系。

[0128] 具体地,能够显微镜观察的玻片中培养过表达鞘氨醇1-磷酸受体4-增强绿色荧光蛋白的细胞系后,处理载体(vehicle)(二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide) hydrochloric acid), 100nM)、鞘氨醇1-磷酸(S1P)(100nM; 激动剂(agonist), 阳对照组)、FTY720(100nM)及SLB736(1 μ M),当处理各个物质30分钟、2小时时用固定液固定并用荧光显微镜观察。此时,为了抑制新受体合成,在处理蛋白合成抑制剂(cycloheximide)的状态下进行培养,当处理各个物质30分钟时利用显微镜进行第一次观察,在清洗细胞后再培养1小时30分钟后再进行第二次观察,并获得图像。

[0129] 其结果如图5所示,在培养细胞30分钟后,可确认处理鞘氨醇1-磷酸、FTY720、SLB736的培养基中各个鞘氨醇1-磷酸受体4的内化,在培养细胞2小时后,可确认处理鞘氨醇1-磷酸(激动剂)的细胞将鞘氨醇1-磷酸受体4再生成细胞膜,相反,FTY720及SLB736没有

再生。由此,可知与FTY720一样,本发明的SLB736作用为鞘氨醇1-磷酸受体4的功能抑制剂。

[0130] 实施例5. 确认通过鞘氨醇1-磷酸受体4短发夹核糖核酸的白细胞介素-1 β 生成抑制

[0131] 同时,对作为巨噬细胞系的原始细胞感染鞘氨醇1-磷酸受体4短发夹核糖核酸慢病毒(lentivirus)后,选择细胞中鞘氨醇1-磷酸受体4表达被抑制的活细胞。测定对所选择的细胞处理脂多糖时的白细胞介素-1 β 生成量变化,并与未感染短发夹核糖核酸慢病毒的对照组(Vec,Vec+LPS)进行比较。

[0132] 如图6所示,其结果可确认与对照组(Vec+LPS)相比,感染鞘氨醇1-磷酸受体4短发夹核糖核酸慢病毒的巨噬细胞系(shS1PR4+LPS)中白细胞介素-1 β 浓度显著减少。

[0133] 实施例6. 确认SLB736的非酒精性脂肪性肝炎发病预防及治疗效果

[0134] 为了确认SLB736化合物的非酒精性脂肪性肝炎发病预防效果,利用了喂食蛋氨酸胆碱缺乏饮食六周的动物模型。

[0135] 通常已知的非酒精性脂肪性肝炎的特征性显微镜检查结果包括脂肪症(steatosis)、肝细胞的球囊变性、小叶内炎症(lobular inflammation)、窦状血管周围纤维化(fibrosis)等,2005年,作为非酒精性脂肪性肝炎临床研究机构的临床研究网络(Clinical Research Network,CRN)通过研究与非酒精性脂肪肝相对应的病变的详细分级系统,提出了非酒精性脂肪肝疾病的活动评分(Nonalcoholic fatty liver disease activity score,NAS),由于具有高度可重现性而广泛用于各种研究中。为此,本发明人基于所述临床研究网络的分类体系,对动物模型的肝组织观察结果的脂肪症的等级(grade of steatosis)、脂肪症的位置(location of steatosis)、小叶内炎症(lobular inflammation)和纤维化(fibrosis)的程度进行评分化,由此,评估了作为本研究对象化合物的SLB736对由蛋氨酸胆碱缺乏饮食引起的非酒精性脂肪性肝病的影响。

[0136] 具体地,将8周龄的小鼠(C57BL6/N,Orient Bio Inc.,韩国)分为两组,通过向对照组仅提供蛋氨酸胆碱缺乏饮食六周来诱导非酒精性脂肪性肝炎,实验组同时提供蛋氨酸胆碱缺乏饮食和1mg/kg/日的SLB736六周后,采取各个小鼠的肝组织并用显微镜观察,从而确认脂肪症程度、小叶内炎症及纤维化程度。其结果可确认,在与SLB736一起给药的小鼠中,脂肪症的程度及小叶内炎症(参照图7的黑色三角形标记)显著减少,纤维化程度(图8)也比SLB736给药组显著减少。

[0137] 为了定量确认这一点,如图9所示,根据所述临床研究网络的非酒精性脂肪肝疾病的活动评分体系进行评价的结果可确认脂肪症程度、小叶内炎症及纤维化程度比对照组均显著改善。

[0138] 同时,为了确认在肝组织中SLB736化合物对炎症性标记及纤维化标记的表达的效果,测定了转化生长因子- β (TGF- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达量。具体地,在提取所述动物模型的肝组织中核糖核酸后,利用定量即时聚合酶链锁反应(Q-PCR)策行信使核糖核酸。其结果可确给药SLB736的小鼠中转化生长因子- β 、肿瘤坏死因子- α 及单核细胞趋化蛋白-1的表达均显著减少(图10)。

[0139] 由此可知,本发明的化合物SLB736具有预防非酒精性脂肪性肝炎的效果。

[0140] 为了确认SLB736化合物的非酒精性脂肪性肝炎治疗效果,利用了通过向8周龄小鼠(C57BL6/N,Orient Bio Inc.,韩国)给药蛋氨酸胆碱缺乏饮食四周来诱导非酒精性脂肪

性肝炎的动物模型。具体地,将诱导所述非酒精性脂肪性肝炎的模型小鼠分为两组,向对照组再提供蛋氨酸胆碱缺乏饮食四周,并向实验组同时提供蛋氨酸胆碱缺乏饮食和5mg/kg/日的SLB736四周后,采取各个小鼠肝组织并用显微镜观察,从而确认小叶内炎症及纤维化程度。

[0141] 其结果可知,在继续提供蛋氨酸胆碱缺乏饮食的对照组中,由于给药蛋氨酸胆碱缺乏饮食,在肝组织中观察到脂肪症、小叶内炎症及纤维化,因此导致非酒精性脂肪性肝炎。与此相反,在同时给药SLB736和普通饮食的小鼠中,脂肪症的程度及小叶内炎症(图11)显著减少,并且纤维化程度(图11)也在SLB736给药组中显著减少。

[0142] 实施例7.比较给药SLB736及FTY720时血液内淋巴细胞减少症

[0143] 据报道,起到鞘氨醇1-磷酸受体的功能抑制剂作用的FTY720具有血液中淋巴细胞减少症(lymphopenia)作为严重的副作用。为此,通过测定给药本发明的SLB736时血液中白细胞及淋巴细胞变化来确认副作用产生可能性。在尸检当天,使用注射器从后腔静脉采血,并将全血冷冻保管于EDTA-2K CBC瓶中。利用自动分析仪(automated analyzer)测定全血中白细胞及淋巴细胞。

[0144] 其结果可知,如图12所示,确认在给药SLB736的老鼠中未出现白细胞及血液中淋巴细胞较少,给药FTY720时没有副作用。

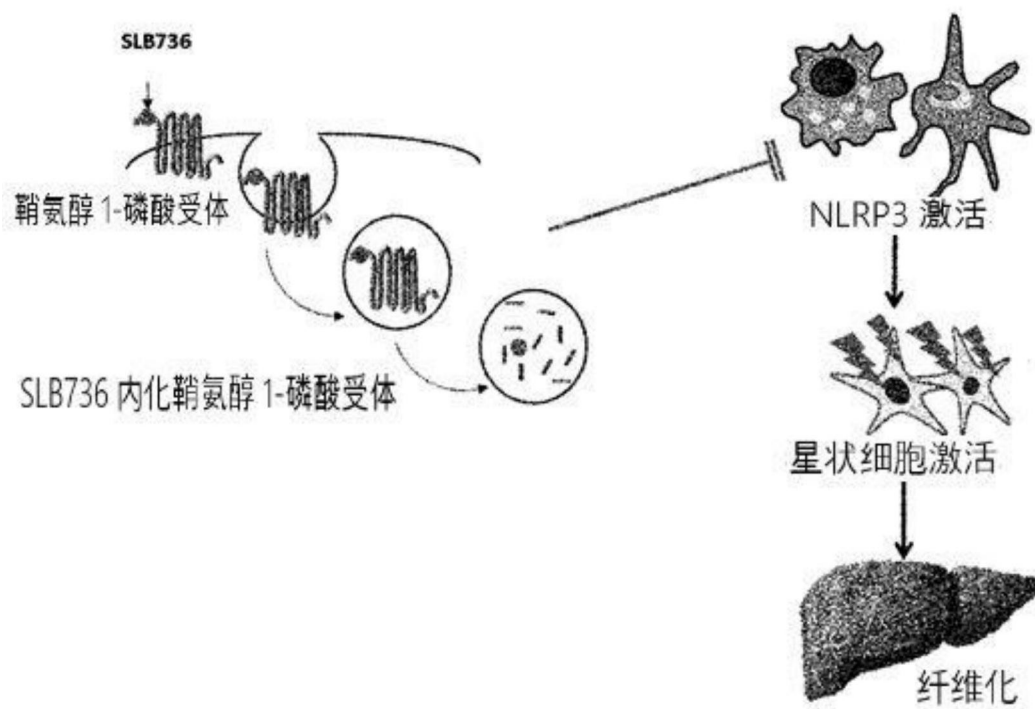


图1

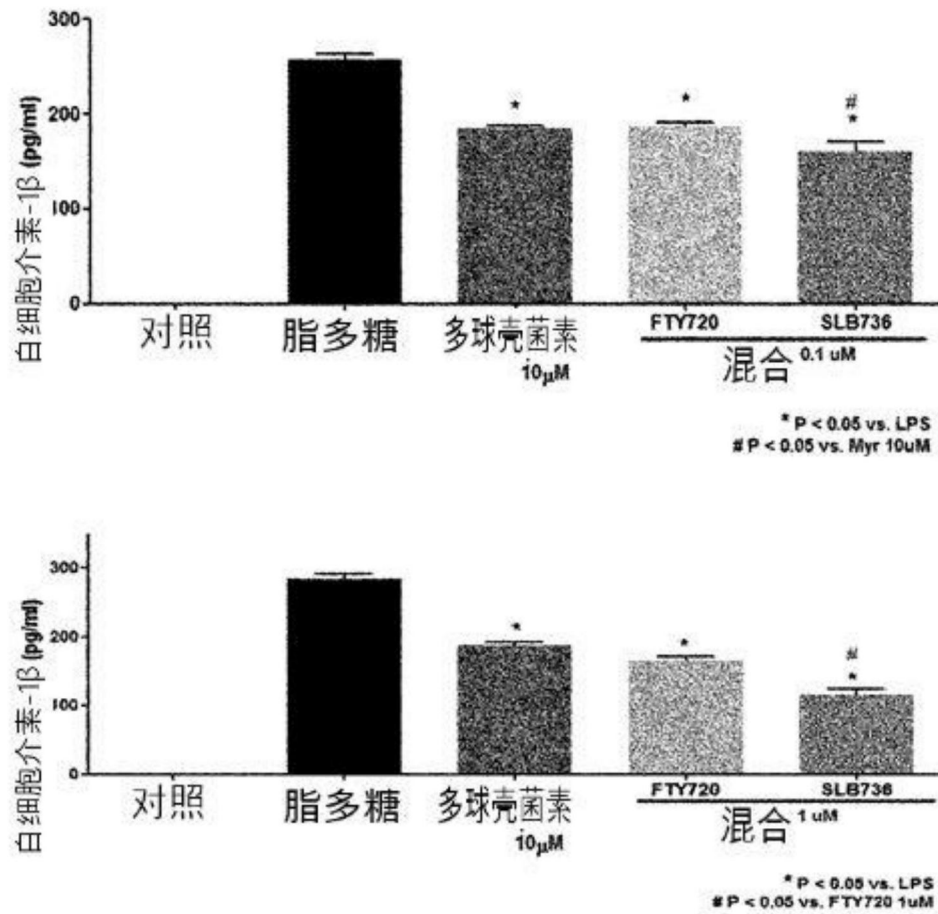


图2



图3

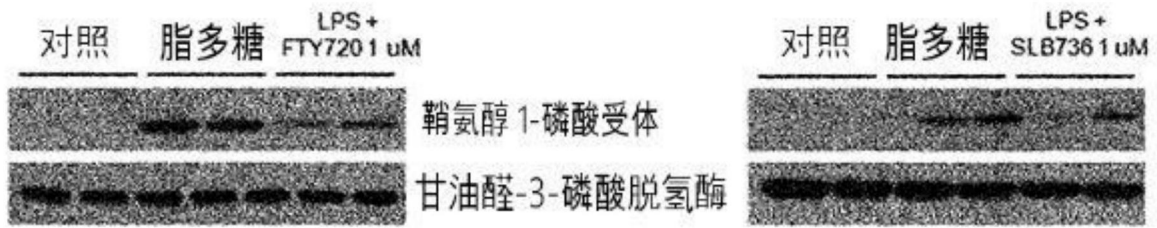


图4

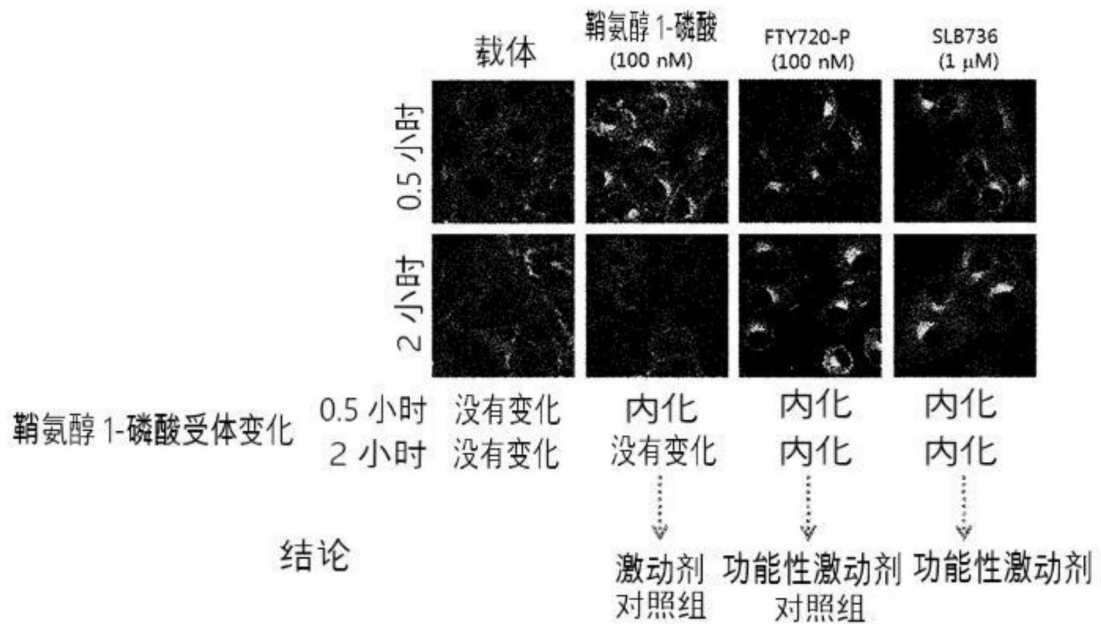


图5

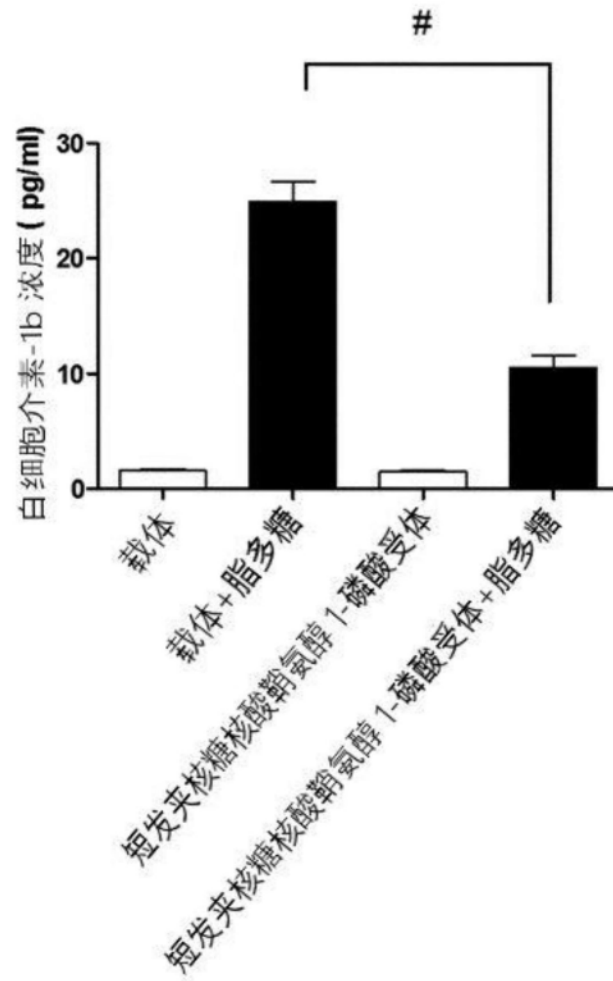


图6

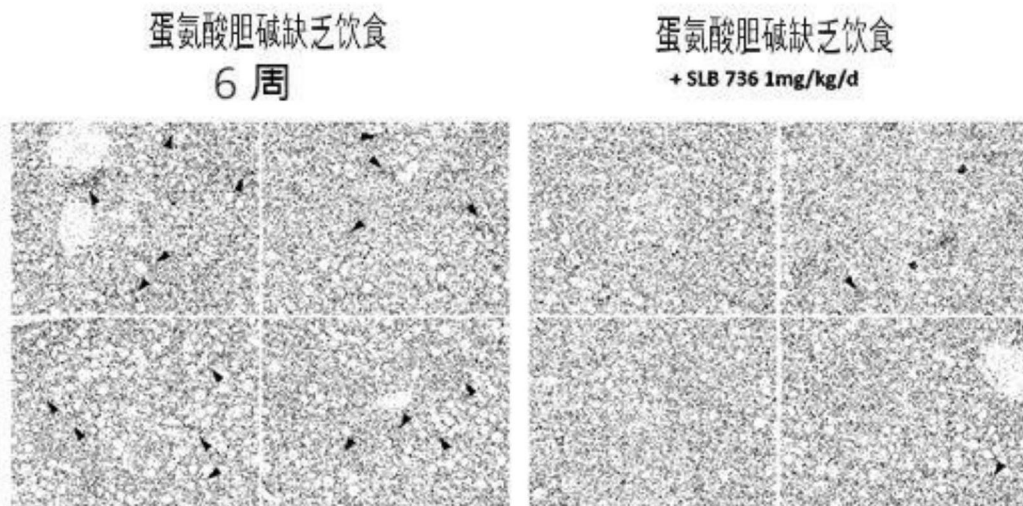


图7

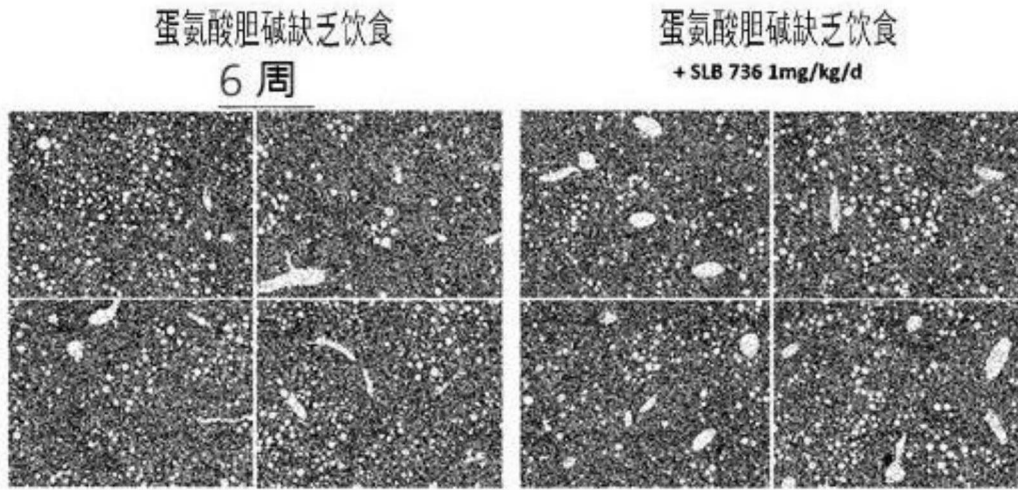


图8

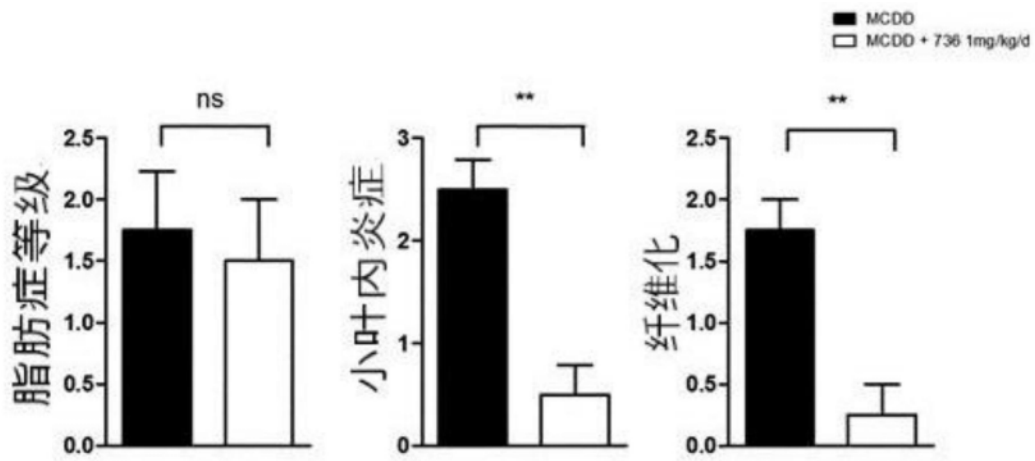


图9

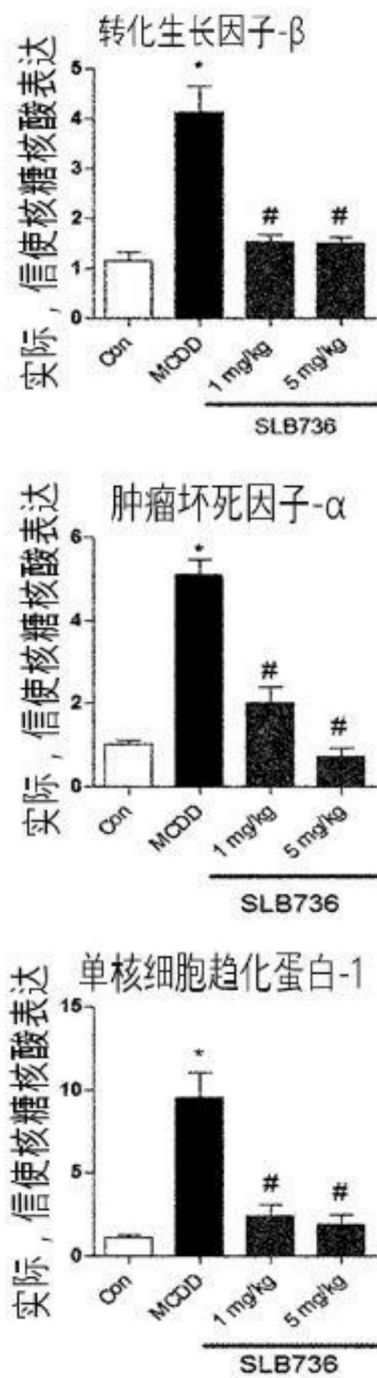


图10

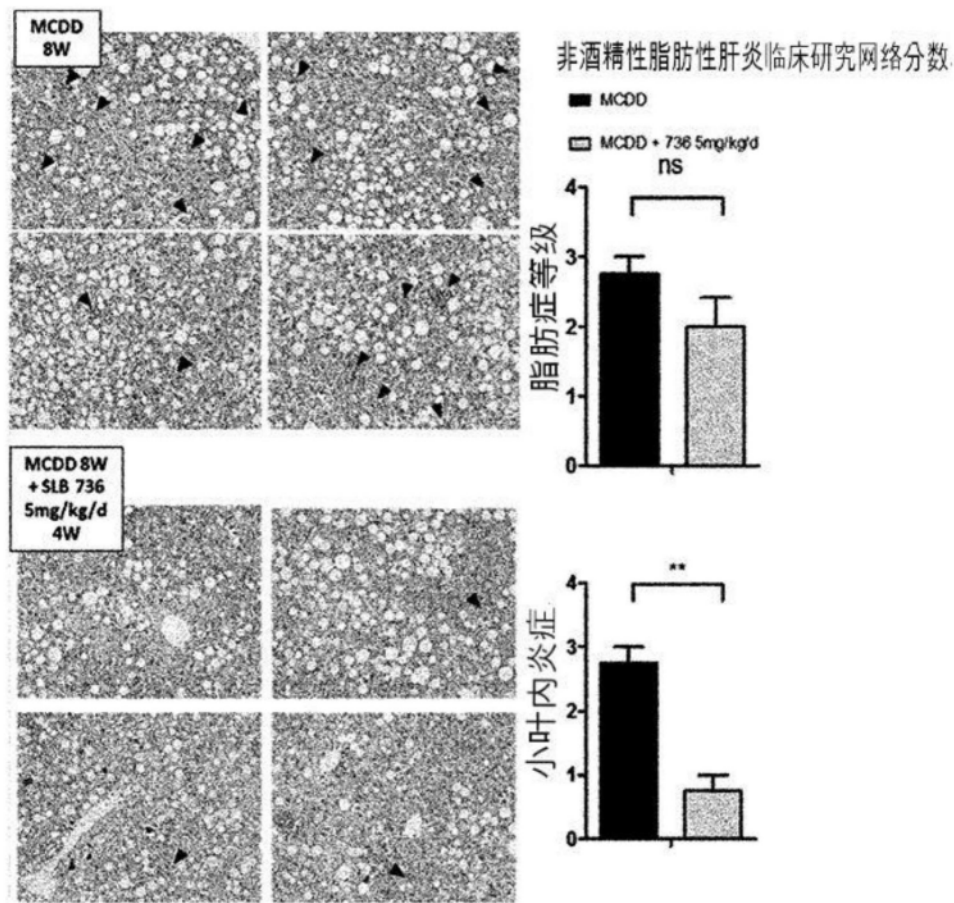


图11a

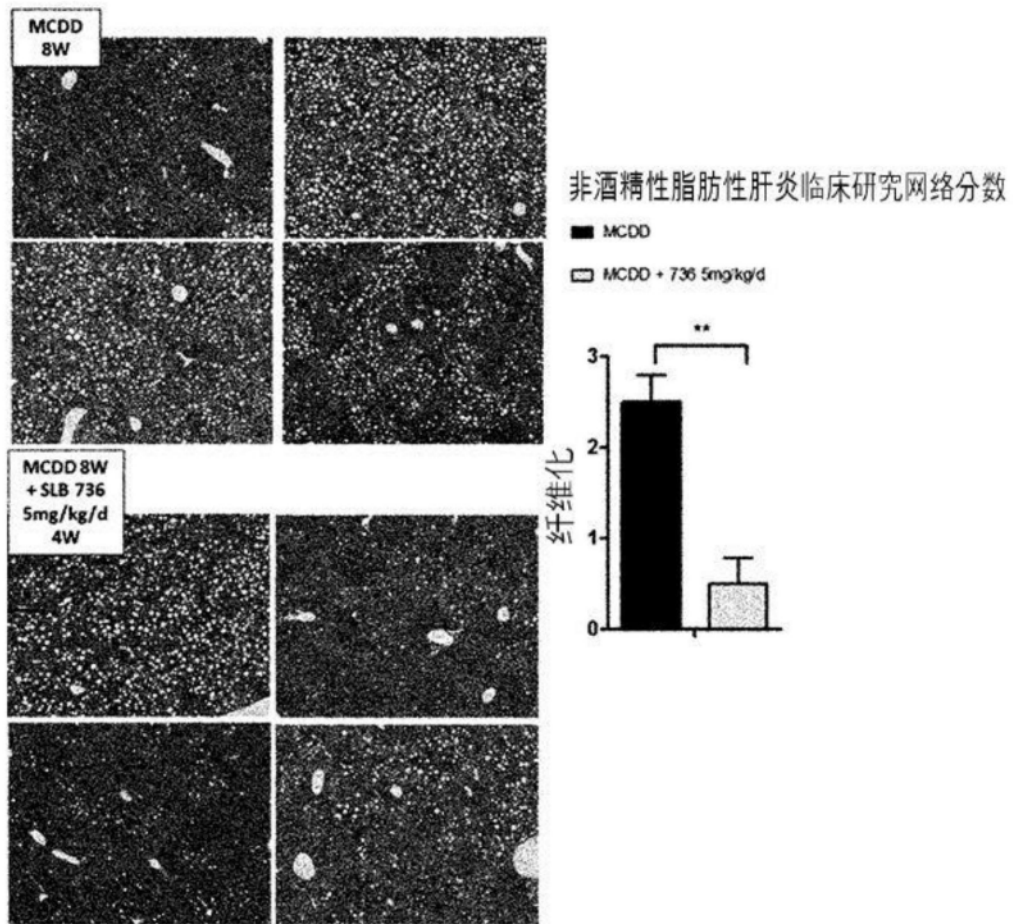


图11b

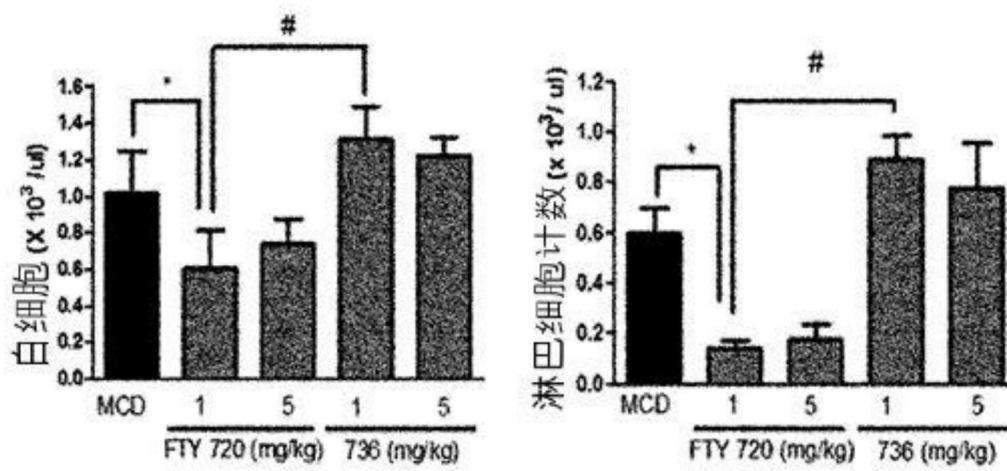


图12