



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108368150 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 25

(21) 申请号 201780004882.0
 (22) 申请日 2017.10.03
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108368150 A
 (43) 申请公布日 2018.08.03
 (30) 优先权数据
 16193684.4 2016.10.13 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.06.19
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2017/075042 2017.10.03
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/069086 EN 2018.04.19
 (73) 专利权人 维瓦赛尔生物技术西班牙有限公司
 地址 西班牙科尔多瓦
 (72) 发明人 爱德华多·穆尼奥斯布兰科
 阿尔贝托·米纳西
 玛丽亚·卢斯·贝利多卡韦略德阿
 尔瓦
 乔瓦尼·阿彭迪诺

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int.Cl.
 C07J 63/00 (2006.01)
 A61K 31/575 (2006.01)
 A61P 25/28 (2006.01)
 A61P 9/10 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 102499925 A, 2012.06.20
 CN 101367861 A, 2009.02.18
 US 8324264 B1, 2012.12.04
 WO 2009/146216 A2, 2009.12.03
 CN 101965184 A, 2011.02.02
 WenYi Jin et al..Triterpenoids and Diarylheptanoids from Alnus hirsuta Inhibit HIF-1 in AGS Cells.《Arch Pharm Res》.2007,第30卷(第4期),第412-418页。(续)

审查员 曾雪怡

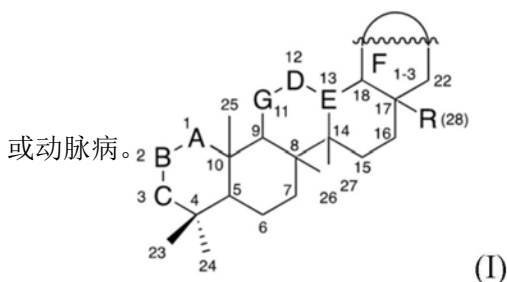
权利要求书22页 说明书47页
序列表3页 附图13页

(54) 发明名称
 氧脲酸三萜系化合物衍生物

(57) 摘要

本发明记载了三萜系化合物和包含式(I)的三萜系化合物衍生物的组合,其中R = -C(O)NHOH。所述三萜系化合物和组合表现出结合PHD2、稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白、激活不同细胞类型中的HIF途径、诱导人内皮血管细胞中的血管发生、在体外和体内表现出神经保护活性、抗糖尿病活性和在体内降低脂质水平以及在体内提高红细胞生成素血浆水平的能力。所述三萜系化合物衍生物可用于治疗响应于HIF激活的病症和疾病,诸如卒中、脑瘫、创伤性损伤和神经变性疾病;以及IBD,心肌缺血-再灌注损伤,急性肺损伤,糖尿病性和慢性伤口,器官移植,急性肾损伤

或动脉病。



CN 108368150 B

[接上页]

(56) 对比文件

Jana Wiemann et al..Targeting cancer cells with oleanolic and ursolic acid derived hydroxamates.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2015,第26卷第907-909页.

Frank Jung et al..Hypoxic Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase via Hypoxia Inducible Factor-1 in Cardiac Myocytes.《Circulation Research》.2000,第86卷第319-325页.

Te-Chun Hsia et al..Maslinic Acid Induces Mitochondrial Apoptosis and Suppresses HIF-1 α Expression in A549 Lung Cancer Cells under Normoxic and Hypoxic Conditions.《Molecules》.2014,第19卷第19892-19906页.

So Young Park et al..Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: possible mediation via hypoxia-inducible factor-1 α signalling.《British Journal of Nutrition》.2012,第109卷第210-222页.

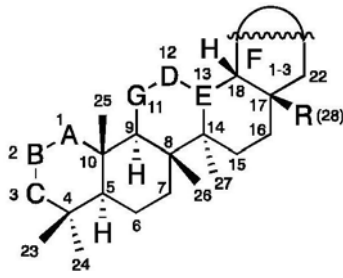
Jana Wiemann et al..Betulinic acid derived hydroxamates and betulin derived carbamates are interesting scaffolds for the synthesis of novel cytotoxic compounds.《European Journal of Medicinal Chemistry》.2015,第106卷第194-210页.

Alberto Minassi et al..Triterpenoid Hydroxamates as HIF Prolyl Hydrolase Inhibitors.《J. Nat. Prod.》.2018,第81卷第2235-2243页.

Ewa Karna et al..Betulinic acid inhibits the expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells.《Mol Cell Biochem》.2010,第340卷第15-20页.

RONGXIN QI et al..Oleanolic acid enhances the radiosensitivity of tumor cells under mimetic hypoxia through the reduction in intracellular GSH content and HIF-1 α expression.《ONCOLOGY REPORTS》.2014,第31卷第2399-2406页.

1. 式 (Ia) 的三萜衍生物或其药用盐,



式(Ia)

其中独立地,

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

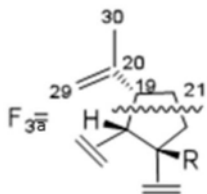
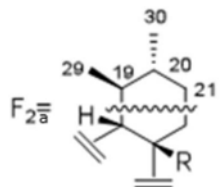
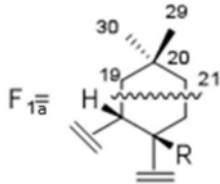
-B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环;

-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-],其中R'是甲基;

-D-E是碳-碳单键或双键;

-F选自F_{1a}, F_{2a}或F_{3a}:

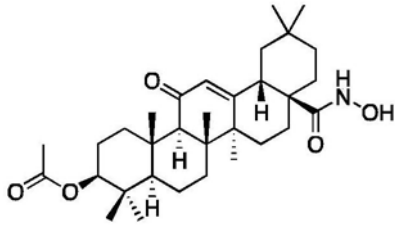


-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

-R是氧脞酸基团(-CONHOH);

并且其中,

-当C为酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]时,式(Ia)的三萜衍生物为(V)



(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺;

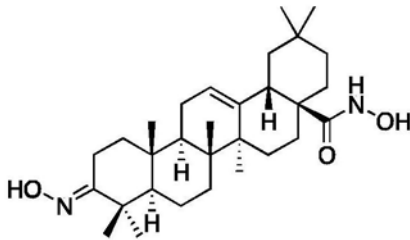
-当B为亚甲基(-CH₂-)时,C是羟基次甲基[-CH(OH)-],D-E是碳-碳双键,G是亚甲基(-CH₂-),并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F是F_{3a};

-当B是亚甲基(-CH₂-)时,C是羟基次甲基[-CH(OH)-],D-E是碳-碳单键,G是亚甲基(-CH₂-),并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F选自F_{1a}或F_{2a};

-当B是亚甲基(-CH₂-)时,C是肟[-C(=N-OH)-],D-E是碳-碳双键,G是亚甲基(-CH₂-),并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F选自F_{1a}或F_{3a}。

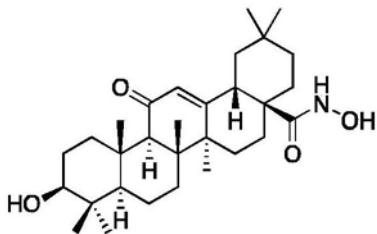
2.根据权利要求1所述的三萜衍生物,其中所述三萜衍生物选自(III),(IV),(V),(VI),(XIV)或(XV):

(III)



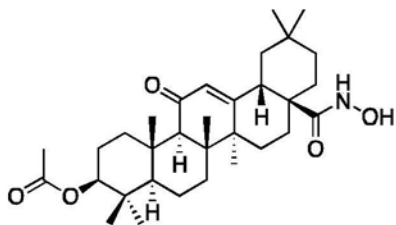
3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(IV)



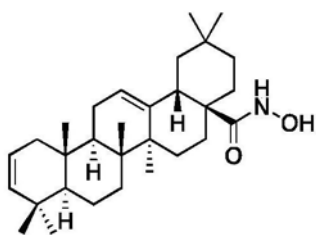
(3β) 3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺

(V)

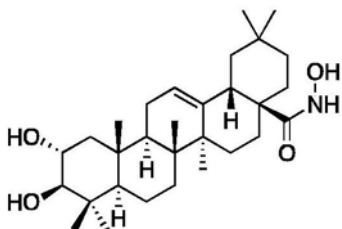


(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺

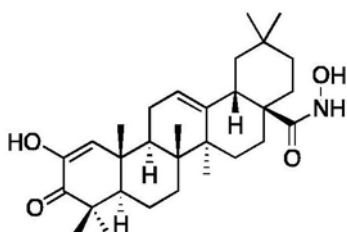
(VI)



齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺
(XIV)

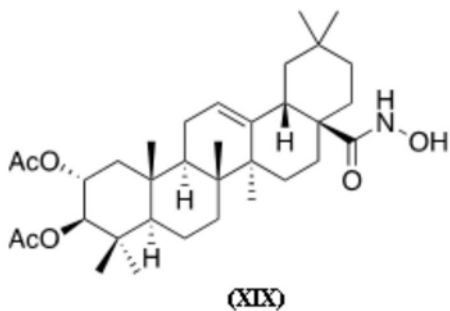
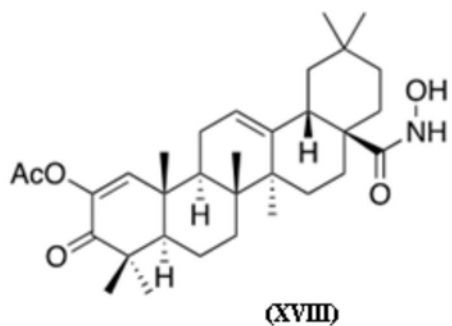


(2 α , 3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺
(XV)



2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺。

3. 在合成权利要求1或2任一项的化合物中的中间体化合物,其选自XVIII或XIX:



4. 根据权利要求1或2任一项所述的式(Ia)的三萜衍生物在制备用于治疗响应于HIF途

径激活的病症或疾病的药物中的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自卒中、脑瘫、创伤性损伤和神经变性病。

6. 根据权利要求4所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自IBD、心肌缺血-再灌损伤、急性肺损伤、糖尿病性和慢性伤口、器官移植、急性肾损伤或动脉病。

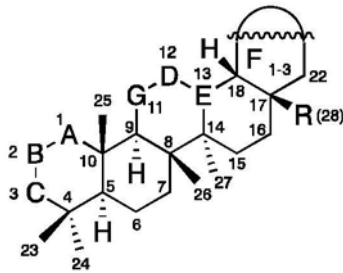
7. 一种药物组合物,其包含至少一种权利要求1-2中任一项所述的式(Ia)的三萜衍生物作为第一活性成分并且还包含至少一种第二活性成分和/或至少一种赋形剂或载体。

8. 根据权利要求7所述的药物组合物在制备用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病的药物中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其中所述响应于HIF途径的激活的病症或疾病选自卒中、脑瘫、创伤性损伤、神经变性病。

10. 根据权利要求8所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自IBD、心肌缺血-再灌损伤、急性肺损伤、糖尿病性和慢性伤口、器官移植、急性肾损伤或动脉病。

11. 式(Ia)的三萜衍生物或其药用盐或(Ib)的三萜衍生物或其药用盐在制备用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病的药物中的应用,



式 (Ia)

其中独立地,

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

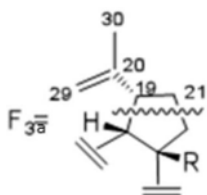
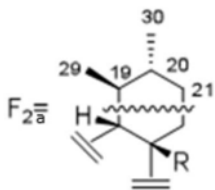
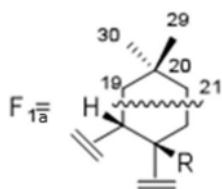
-B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环;

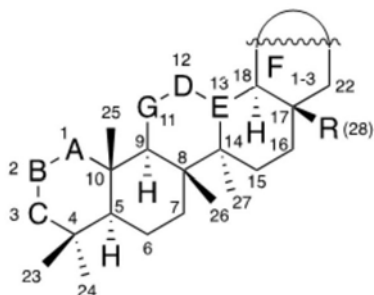
-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

-D-E是碳-碳单键或双键;

-F选自F_{1a}, F_{2a}或F_{3a};



-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且
-R是氧肟酸基团(-CONHOH);



式 (Ib)

其中独立地,

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

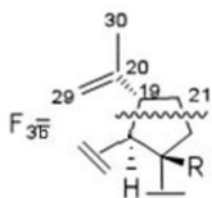
-B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;

-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 肟[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

-D-E是碳-碳单键或双键;

-F是F_{3b};

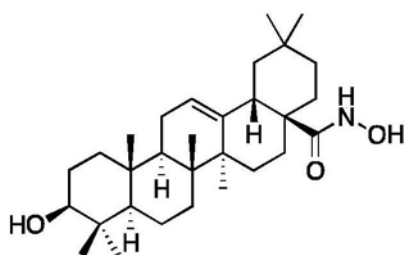


-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

-R是氧肟酸基团(-CONHOH)。

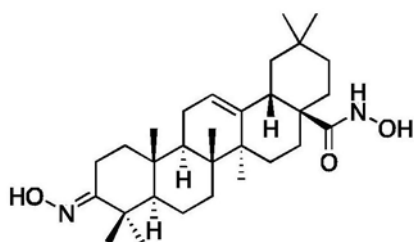
12. 根据权利要求11所述的应用,其中所述三萜衍生物选自(II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV)或(XV):

(II)



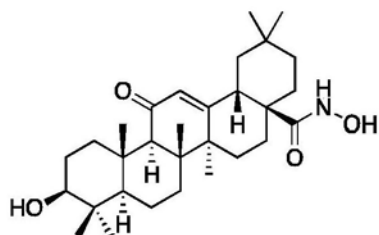
(3β)-3-羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(III)



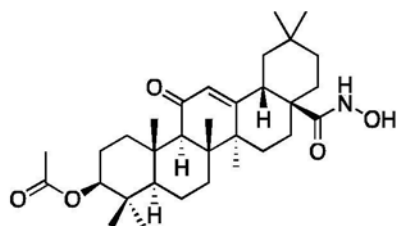
3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(IV)



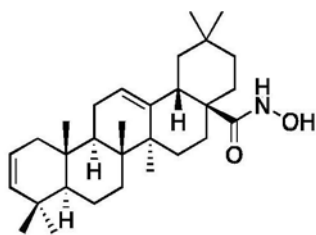
(3β)-3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺

(V)

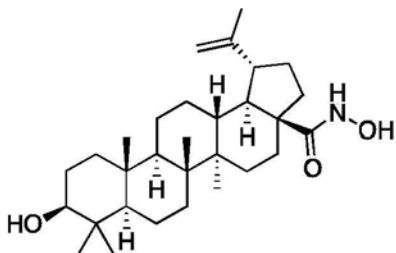


(3β)-3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺

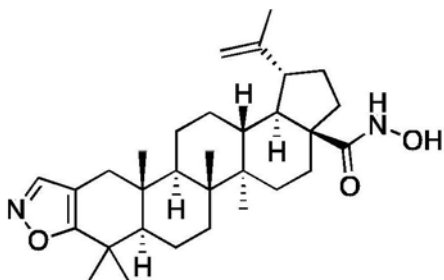
(VI)



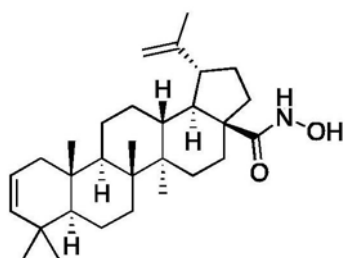
齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺
(VII)



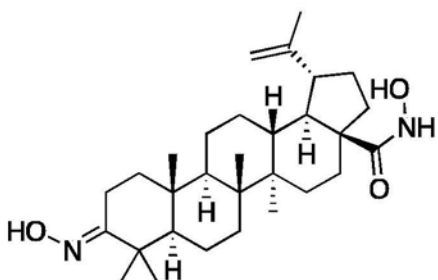
(3 β) 3-羟基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺
(VIII)



羽扇-2-烯并[2,3-d]异噁唑-N-羟基-28-酰胺
(X)

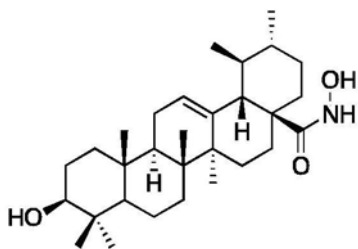


羽扇-2,20(29)-二烯-N-羟基-28-酰胺
(XI)

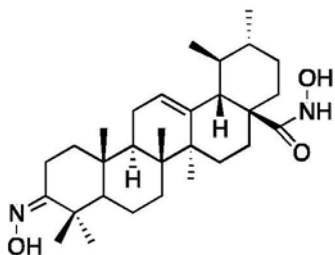


3-羟基亚胺基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺

(XII)

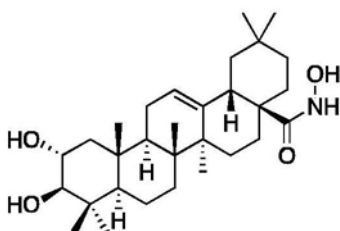
(3 β) 3-羟基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺

(XIII)

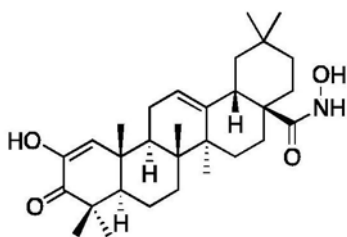


3羟基亚胺基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺

(XIV)

(2 α , 3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(XV)

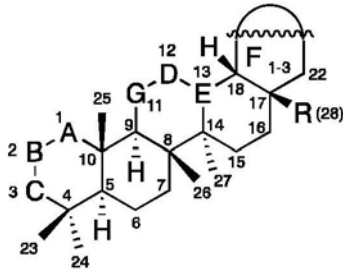


2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺。

13. 根据权利要求11或12所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自卒中、脑瘫、创伤性损伤和神经变性病。

14. 根据权利要求11或12所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自IBD、心肌缺血-再灌损伤、急性肺损伤、糖尿病性和慢性伤口、器官移植、急性肾损伤或动脉病。

15. 药物组合物在制备用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病的药物中的应用,所述药物组合物包含至少一种式(Ia)的三萜衍生物或其药用盐或式(Ib)的三萜衍生物或其药用盐;和至少一种赋形剂或载体,



式(Ia)

其中独立地，

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键；

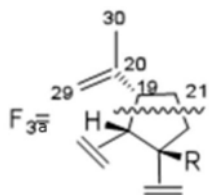
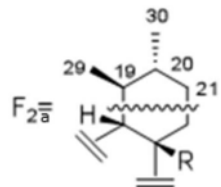
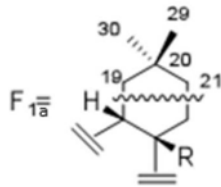
-B选自亚甲基(-CH₂-)，烯次甲基(=CH-)，羟基次甲基[-CH(OH)-]，或羟基化烯碳[-C(OH)=]；

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键；或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分，其中至少一个所述杂原子是氮；并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环；

-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-]，酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]，烯次甲基(=CH-)，羰基[-C(=O)-]，脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-]，其中R'是甲基；

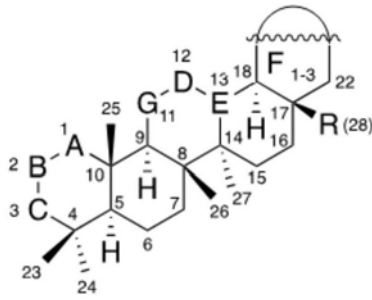
-D-E是碳-碳单键或双键；

-F选自F_{1a}，F_{2a}或F_{3a}：



-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-]；并且

-R是氧脞酸基团(-CONHOH)；



式 (Ib)

其中独立地，

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键；

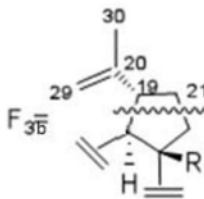
-B选自亚甲基(-CH₂-)，烯次甲基(=CH-)，羟基次甲基[-CH(OH)-]，或羟基化烯碳[-C(OH)=]；

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键；或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分，其中至少一个所述杂原子是氮；

-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-]，酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]，烯次甲基(=CH-)，羰基[-C(=O)-]，脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-]，其中R'是甲基；

-D-E是碳-碳单键或双键；

-F是F_{3b}：

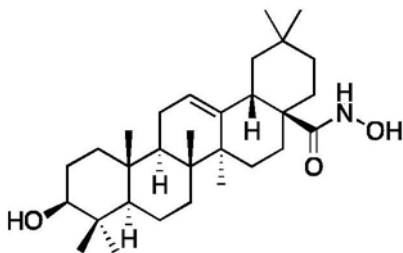


-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-]；并且

-R是氧脞酸基团(-CONHOH)。

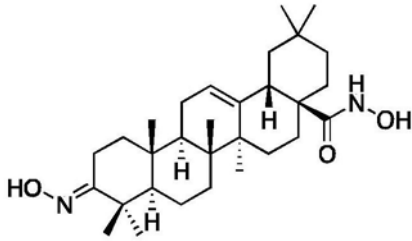
16. 根据权利要求15所述的应用，其中所述至少一种三萜衍生物选自(II)，(III)，(IV)，(V)，(VI)，(VII)，(VIII)，(X)，(XI)，(XII)，(XIII)，(XIV)和(XV)：

(II)

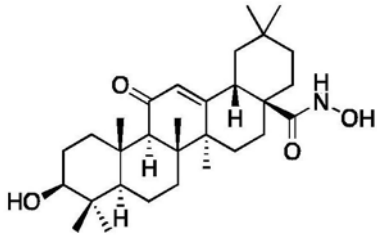


(3β) 3-羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

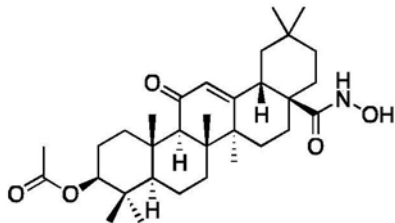
(III)



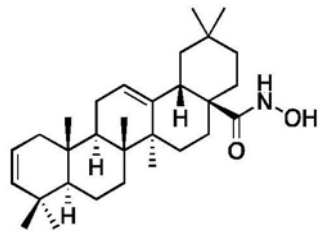
3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺
(IV)



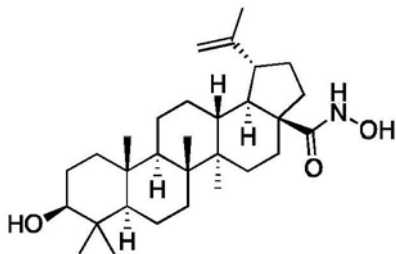
(3β) 3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺
(V)



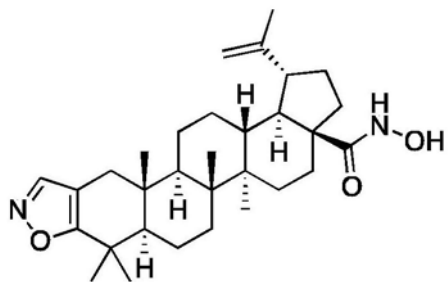
(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺
(VI)



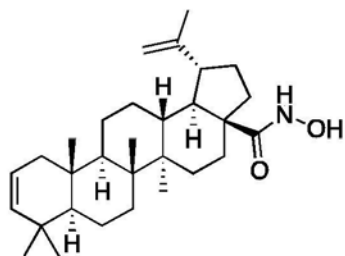
齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺
(VII)



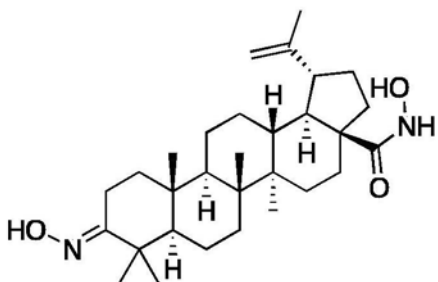
(3β) 3-羟基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺
(VIII)



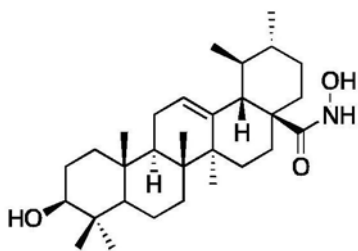
羽扇-2-烯并[2,3-d]异噁唑-N-羟基-28-酰胺
(X)



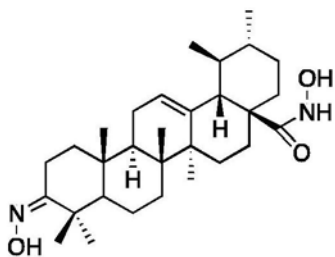
羽扇-2,20(29)-二烯-N-羟基-28-酰胺
(XI)



3-羟基亚胺基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺
(XII)

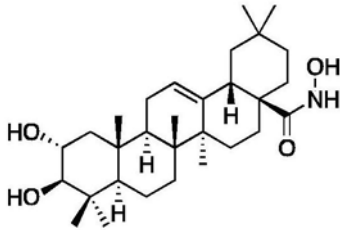


(3β) 3-羟基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺
(XIII)

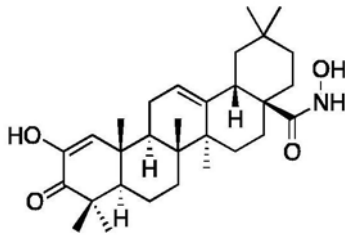


3羟基亚胺基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺

(XIV)

(2 α , 3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(XV)



2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺。

17. 根据权利要求15或16中任一项所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自卒中、脑瘫、创伤性损伤和神经变性病。

18. 根据权利要求15或16中任一项所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自IBD、心肌缺血-再灌损伤、急性肺损伤、糖尿病性和慢性伤口、器官移植、急性肾损伤或动脉病。

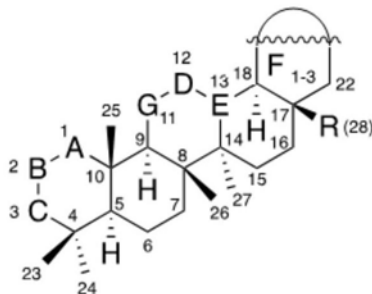
19. 根据权利要求4所述的应用,其中所述响应于HIF途径的病症或疾病独立地选自糖尿病、高脂血症或高甘油三酯血症。

20. 根据权利要求8所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病独立地选自糖尿病、高脂血症或高甘油三酯血症。

21. 根据权利要求11或12任一项所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病独立地选自糖尿病、高脂血症或高甘油三酯血症。

22. 根据权利要求15或16任一项所述的应用,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病独立地选自糖尿病、高脂血症或高甘油三酯血症。

23. 根据权利要求11所述的应用,其中所述三萜衍生物是式(Ib)的三萜衍生物:



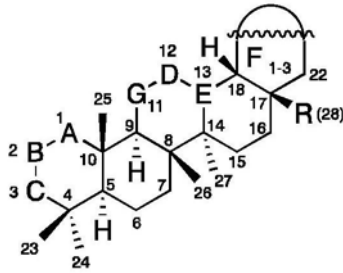
式(Ib)。

24. 根据权利要求1或2中任一项所述的三萜衍生物在制备用于提高红细胞生成素血浆水平的药物中的应用。

25. 根据权利要求7所述的药物组合物在制备用于提高红细胞生成素血浆水平的药物

中的应用。

26. 式 (Ia) 的三萜衍生物或其药用盐或式 (Ib) 的三萜衍生物或其药用盐在制备用于提高红细胞生成素血浆水平的药物中的应用,



式(Ia)

其中独立地,

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

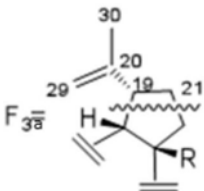
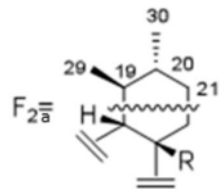
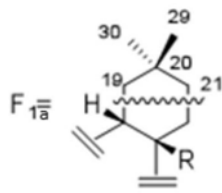
-B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环;

-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

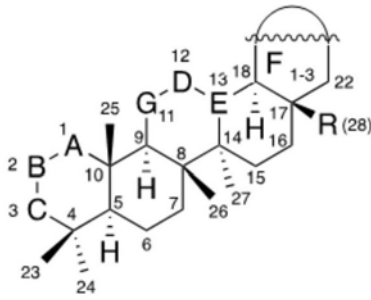
-D-E是碳-碳单键或双键;

-F选自F_{1a}, F_{2a}或F_{3a}:



-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

-R是氧脞酸基团(-CONHOH);



式 (Ib)

其中独立地，

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键；

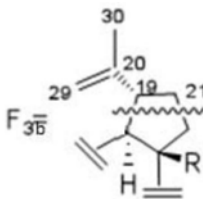
-B选自亚甲基(-CH₂-)，烯次甲基(=CH-)，羟基次甲基[-CH(OH)-]，或羟基化烯碳[-C(OH)=]；

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键；或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分，其中至少一个所述杂原子是氮；

-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-]，酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]，烯次甲基(=CH-)，羰基[-C(=O)-]，脞[-C(=N-OH)-]或脲[-C(=N-NH₂)-]，其中R'是甲基；

-D-E是碳-碳单键或双键；

-F是F_{3b}：

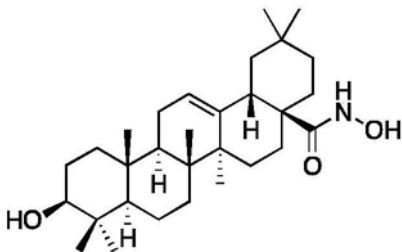


-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-]；并且

-R是氧脞酸基团(-CONHOH)。

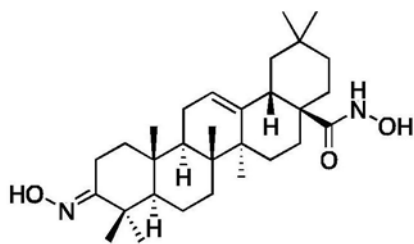
27. 根据权利要求26所述的应用，其中所述三萜衍生物选自(II)，(III)，(IV)，(V)，(VI)，(VII)，(VIII)，(X)，(XI)，(XII)，(XIII)，(XIV)或(XV)：

(II)

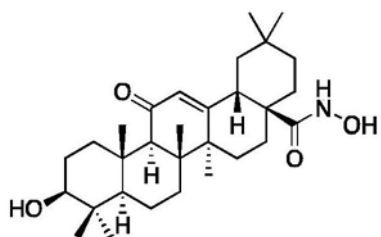


(3B) 3-羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

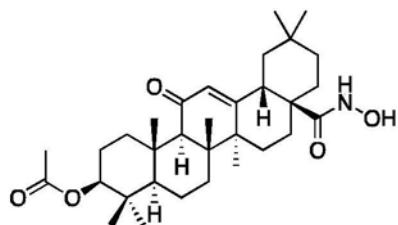
(III)



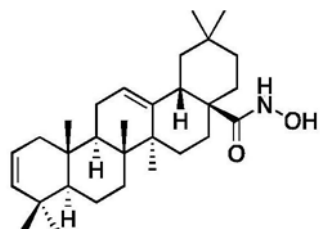
3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺
(IV)



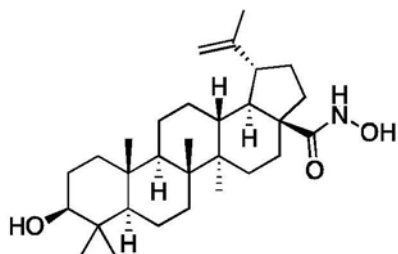
(3β) 3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺
(V)



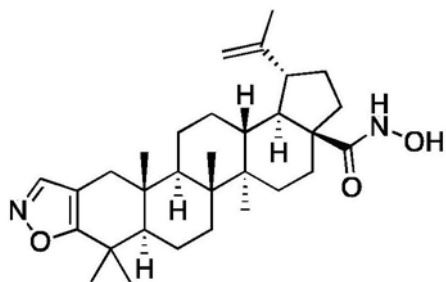
(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺 (VI)



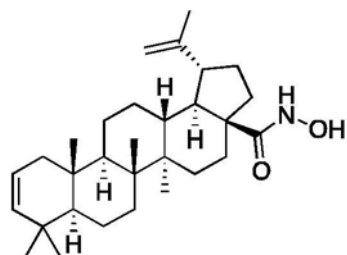
齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺
(VII)



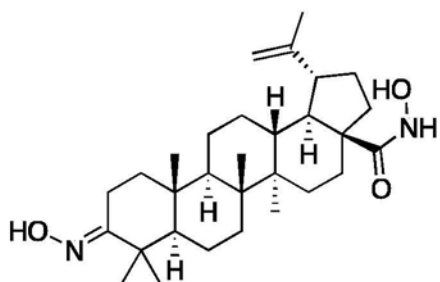
(3β) 3-羟基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺 (VIII)



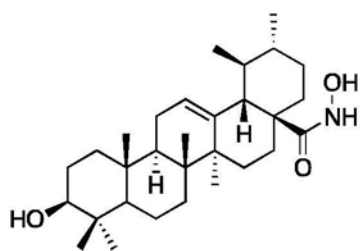
羽扇-2-烯并[2,3-d]异噁唑-N-羟基-28-酰胺
(X)



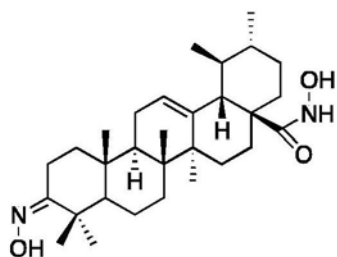
羽扇-2,20(29)-二烯-N-羟基-28-酰胺
(XI)



3-羟基亚胺基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺
(XII)

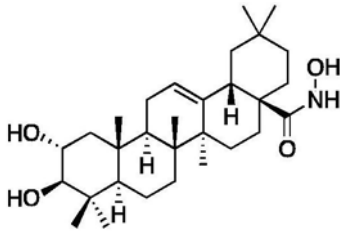


(3β) 3-羟基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺
(XIII)

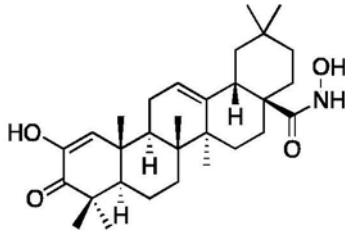


3羟基亚胺基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺

(XIV)

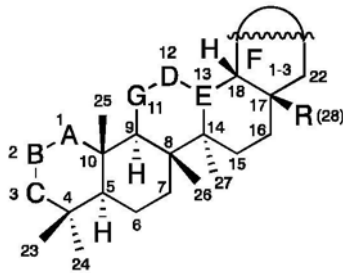
(2 α , 3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(XV)



2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺。

28. 药物组合物在制备用于提高红细胞生成素血浆水平的药物中的应用,所述药物组合物包含至少一种式(Ia)的三萜衍生物或其药用盐或式(Ib)的三萜衍生物或其药用盐;和至少一种赋形剂或载体,



式(Ia)

其中独立地,

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

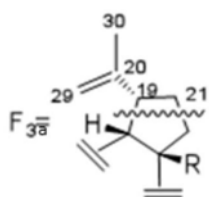
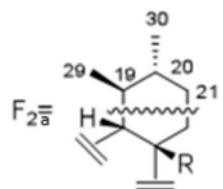
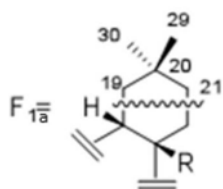
-B选自亚甲基(-CH₂-),烯次甲基(=CH-),羟基次甲基[-CH(OH)-],或羟基化烯碳[-C(OH)=];

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环;

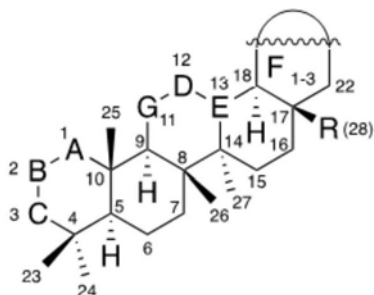
-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-],酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-],烯次甲基(=CH-),羰基[-C(=O)-],脞[-C(=N-OH)-]或脎[-C(=N-NH₂)-],其中R'是甲基;

-D-E是碳-碳单键或双键;

-F选自F_{1a}, F_{2a}或F_{3a};



-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且
-R是氧肟酸基团(-CONHOH);



式 (Ib)

其中独立地,

-A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

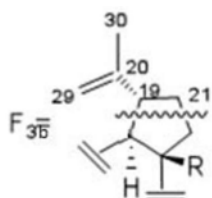
-B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

-B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;

-C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 肟[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

-D-E是碳-碳单键或双键;

-F是F_{3b};

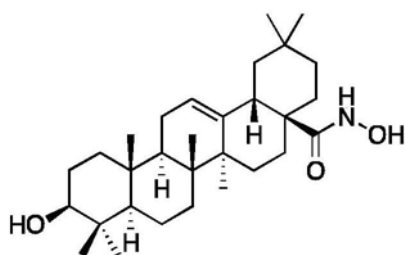


-G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

-R是氧肟酸基团(-CONHOH)。

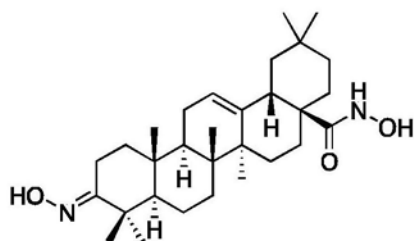
29. 根据权利要求28所述的应用,其中所述三萜衍生物选自(II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV)或(XV):

(II)



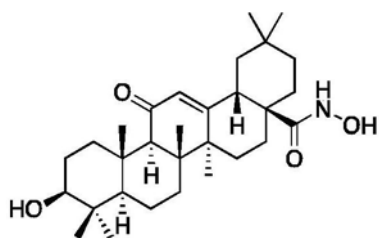
(3β)-3-羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(III)



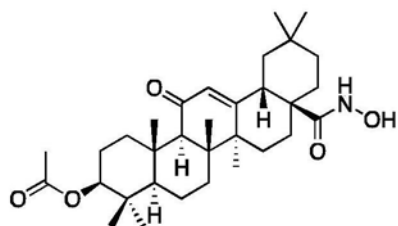
3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(IV)



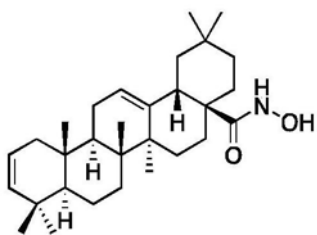
(3β)-3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺

(V)

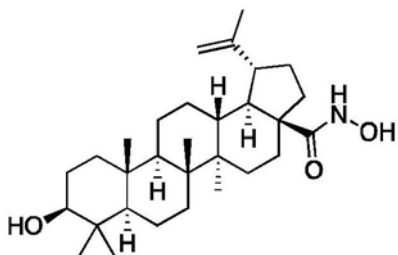


(3β)-3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺

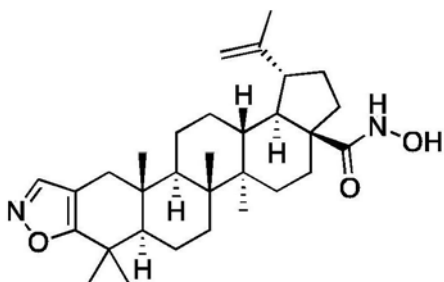
(VI)



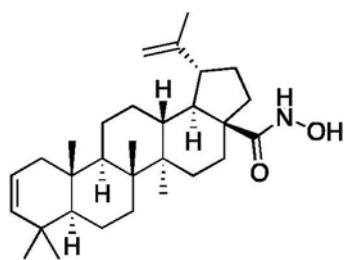
齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺
(VII)



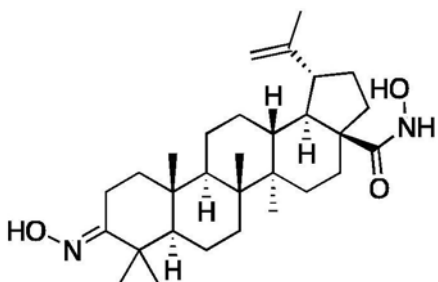
(3 β) 3-羟基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺
(VIII)



羽扇-2-烯并[2,3-d]异噁唑-N-羟基-28-酰胺
(X)

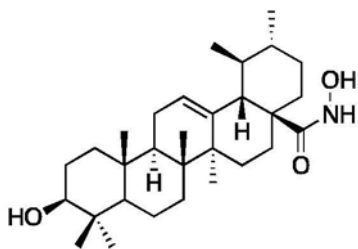


羽扇-2,20(29)-二烯-N-羟基-28-酰胺
(XI)

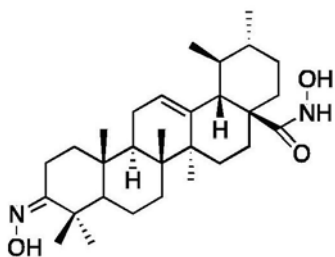


3-羟基亚胺基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺

(XII)

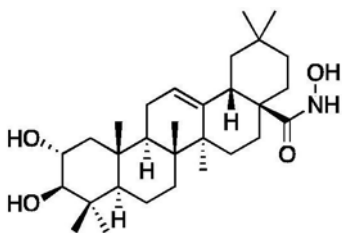
(3 β) 3-羟基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺

(XIII)

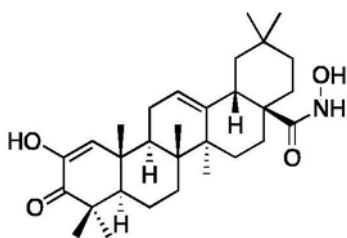


3羟基亚胺基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺

(XIV)

(2 α , 3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

(XV)



2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺。

氧肟酸三萜系化合物衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及新型的三萜系化合物衍生物,以及所述化合物的合成。此外,本发明涉及其作为药物和在治疗中的用途,特别是作为HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白的稳定剂,HIF-1途径的激活剂,以及在治疗响应于HIF-1 α 和HIF-2稳定化的疾病和病症中的用途。本发明还提供包含所述化合物的药物组合物和使用所述化合物治疗疾病的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 哺乳动物细胞需要维持恰当的氧稳态才能实现其需氧代谢和能量产生。自从发现了低氧诱导性因子(HIF)-1,便已经在生物学情形中广泛研究了作为由HIF转录因子引起的氧感知的基础的信号传导机制(Wang等人,Redox Rep.1996Apr.;2(2):89-96)。HIF由氧不稳定性 α 和组成型表达的 β 亚基组成,其驱动多种参与多样性细胞过程的基因的转录,所述多样性细胞过程包括红细胞生成、血管生成、能量代谢、缺血和炎症(Semenza等人,J.Biol.Chem.1994Sept 23;269(38):237357-63和Eltzschig等人,Nat.Rev.Drug Discov.2014Nov;13(11):852-69)。HIF几乎专门以两种形式存在于细胞中:HIF-1和HIF-2。它们是异型二聚体转录因子,在HIF-1和HIF-2的情形中,分别由组成型产生的高丰度HIF- β 亚基和HIF-1 α 或HIF-2 α 配偶体组成,具有48%的序列同源性(Rabinowitz MH,J.Med.Chem.2013Dec 12;56(23):9369-4025)。HIF-1通常与针对低氧的代谢和血管响应相关,而HIF-2与血管系统相关,但也稍微更与红细胞生成相关(Ratcliffe PJ,J.Clin.Invest.2007Apr;117(4):862-5)。

[0004] 氧控制HIF-1 α 的机制已经通过鉴定HIF脯氨酰羟化酶(PHD)得到揭示(Bruick和McKnight,Science 2001Nov 9;294(5545):1337-40)。在含氧量正常(normoxia)时,PHD使HIF-1 α 氧依赖性降解(ODD)结构域中的脯氨酸残基羟基化,由此允许与VHL蛋白(Hippel Lindau protein,pVHL)-延伸蛋白B-延伸蛋白C结合,导致活性遍在蛋白化和半衰期约为5分钟的降解。另一方面,低氧下氧缺乏削弱PHD对HIF-1 α 的羟基化,产生还原的HIF-1 α 、周转(turnover)和随后诱导靶基因转录(Rabinowitz MH,J.Med.Chem.2013Dec 12;56(23):9369-4025)。PHD属于双加氧酶家族,它们的催化活性需要氧、铁和2-氧戊二酸(2-OG)。它们针对氧的低亲和力是生理氧浓度的约2至10倍高,这允许该酶作用为氧传感器。已经鉴定了三种PHD同种型(PHD1,PHD2和PHD3),并且已知它们的底物是相当多样性的和同种型-特异性的(Rabinowitz MH,J.Med.Chem.2013Dec 12;56(23):9369-4025;和Eltzschig等人,Nat.Rev.Drug Discov.2014Nov;13(11):852-69)。

[0005] 认为PHD2在调节HIF途径中是关键性的。具体而言,在条件性敲除PHD2时观察到增强的血管生成和提高的血管内皮生长因子(VEGF)-A和红细胞生成素(EPO)水平(Takeda等人,Circulation 2007Aug.14;116(7):774-81)。这些观察以及之前的HIF增加EPO释放和同时增加红细胞生成的报道暗示:通过调节PHD激活HIF可能对患有贫血和缺血相关疾病的患者有益。因此,已经寻求通过抑制PHD活性激活HIF途径的药理学方式来治疗系统和局部疾病,所述疾病的治疗可以得益于HIF激活(Rabinowitz MH,J.Med.Chem.2013Dec 12;56(23):9369-4025;和Eltzschig等人,Nat.Rev.Drug Discov.2014Nov;13(11):852-69)。

[0006] 低氧和炎症在多个水平上密切相关,并且在多种人类疾病中具有功能作用。事实上,宽泛的临床病症特征在于低氧-或缺血-驱动的炎症或炎症相关的低氧。日益增多的证据表明,炎症损伤特征在于发生组织低氧,其可能是增加的代谢和减少的氧供应的结果。例如,这是在患有炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)的患者中观察到的肠道炎症过程中的情形,所述炎性肠病包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)和局限性肠炎(Crohn's disease)(Karhausen等人,J.Clin Invest.2004Oct;114(8):1098-106)。此类炎性低氧由代谢供应和需求率的明显变化引起。新出现的证据表明,在组织低氧过程中同时抑制PHD和随后稳定HIF能够起作用作为内源性适应反应,以抵消低氧-驱动的炎症和恢复正常的细胞功能(Eltzschig等人,Nat.Rev.Drug Discov.2014Nov;13(11):852-69)。

[0007] 续发于诸如大脑缺氧的脑损伤和神经变性过程的神经损害是涉及炎性变化的复杂过程。在这些病症中已经观察到由HIF-1 α 的稳定和反式激活介导的与存活或细胞死亡相关的普通机制的激活。PHD是HIF-1 α 的氧依赖性降解的看门人,并且还起作用作为细胞代谢的集成传感器(Aragonés等人,Cell Metab.2009Jan 7;9(1):11-22)。大约二十年前发现了低氧预处理(hypoxic preconditioning,HP)保护免于后续更严重的缺氧(anoxia)的现象。之后,已经在体外和体内急性低氧模型中透彻研究了HP的作用。尽管还没有完全公开准确的机制,但是已经推断了潜在的分子机制。例如,HP激活很多种内源性保护介质(包括HIF-1 α 和HIF-2 α)稳定化增加了在严重的氧缺乏下细胞存活的能力(Wu等人,2012,The protective role of hypoxic preconditioning in CNS(CNS中低氧预处理的保护作用),Anoxia,Dr.Pamela Padilla(Ed.),InTech,DOI:10.5772/27621)。

[0008] 存在低氧的脑病主要包括卒中(stroke)、脑瘫(cerebral palsy)、创伤性损伤等。直到现在,尚没有任何有效的药物保护脑免受这些疾病。HP机制的公开将有助于预防所述疾病的药物发现。多种针对低氧的细胞适应性反应通过HIF-1 α 介导,并且HP对该因子的激活增强耐受严重缺氧或缺血的能力。另一方面,HIF-1的靶基因参与能量稳态,诸如调节红细胞生成中的EPO,血管生成中的血管内皮生长因子(VEGF),葡萄糖摄入中的葡萄糖传递物(GLUT)和无氧酵解的酵解酶(Speer等人,Free Radio.Biol.Med.2013Sep;62:23-36)。并且,已经报道,在少突胶质细胞中激活HIF-1 α 诱导EPO,其在少突胶质细胞中赋予针对兴奋性中毒(excitotoxicity)的保护作用(Sun等人,J.Neurosci.2010Jul 14;30(28):9621-30)。在这一意义上,也已经证明了EPO在诸如多发性硬化(Multiple Sclerosis)、卒中和创伤性脑损伤的一些疾病中的益处(Peng等人,J.Neurosurg.2014Sep;121(3):653-64;Ehrenreich等人,Stroke 2009Dec;40(12):e647-56;Li等人,Ann.Neurol.2004Dec;56(6):767-77)。另外,低氧模拟剂(即,产生的生物反应与发生低氧时产生的生物反应相同的药剂),诸如去铁胺(desferrioxamine,DFX)防护由3-硝基丙酸(3-nitropropionic acid)诱导的神经元损伤(Yang等人,J.Neurochem.2005May;96(3):513-25)。因此,低氧模拟性小分子对PHD的抑制作用代表一种令人感兴趣的策略或用于存在低氧的病症的临床管理的神经保护性疗法的开发,所述存在低氧的病症诸如卒中,脑瘫,创伤性损伤和神经变性疾病,诸如多发性硬化、亨廷顿病(Huntington disease)、阿尔茨海默病(Alzheimer disease)和帕金森病(Parkinson disease)。

[0009] 已经在动物模型中进行了大量的药理学研究(通常使用非特异性PDH2抑制剂),并且已经进行了一些临床研究。事实上,一些公司正参与用于贫血和其他适应证的PHD抑制剂

的发现和研发,其他适应证如IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,器官移植,急性肾损伤和动脉疾病,它们是一些研究者积极追求PHD抑制剂作为新型治疗方法的领域(Rabinowitz MH, J. Med. Chem. 2013 Dec 12; 56 (23) : 9369-4025; 和Eltzschig等人, Nat. Rev. Drug Discov. 2014 Nov; 13 (11) : 852-69)。

[0010] HIF-选择性PHD作为HIF表达的调节剂的初始记载已经为开发基于PHD的分子工具和疗法提供了模板。通过2-OG类似物使PHD药理学失活足以稳定HIF-1 α ,但是这一作用就个体PHD同种型来说是非特异性的,并且体外研究表明HIF1 α 的ODD序列被PHD2最有效地羟基化(Rabinowitz MH, J. Med. Chem. 2013 Dec 12; 56 (23) : 9369-4025)。这些观察已经对鉴定修饰酶的小分子抑制剂产生了相当大的兴趣。事实上,已经记载了一些PHD抑制剂种类,包括铁螯合剂,如DFX,胍苯哒嗪(hydralazine), AKB[?]4924, FG[?]2229, TM[?]6008和l[?]mimosine; CUL2 deneddyators, 如MLN4924; 2-OG模拟物, 如ximethyloxalylglycine和N-草酰-d-苯丙氨酸; PHD活性位点阻断剂, 如吡唑并吡啶(pyrazolopyridines), 8[?]羟基喹啉, 化合物A, FG[?]4497和TM[?]6089; 和Fe²⁺取代基, 如Co²⁺, Ni²⁺和Cu²⁺。这些化合物的作用机制是基于这样的观察: 共底物2-OG与携带必需的Fe²⁺离子的催化结构域的结合对于酶PHD2活性是极其重要的。因此, 在结构上模拟2-OG的化合物, 如N-草酰甘氨酸或其前体DMOG, 通过阻断共底物的进入而抑制PHD2 (Rabinowitz MH, J. Med. Chem. 2013 Dec 12; 56 (23) : 9369-4025; 和Eltzschig等人, Nat. Rev. Drug Discov. 2014 Nov; 13 (11) : 852-69)。

[0011] DFX是氧肟酸(hydroxamic acid)衍生物,其作用为金属螯合剂,在临床应用上用于治疗急性铁中毒和由于输血依赖性贫血(transfusion-dependent anemias)导致的慢性铁超负荷。然而,没有标明DFX用于治疗慢性疾病,并且,主要由于肾脏排泄所述药物和铁螯合物,其在严重的肾病中是禁忌使用的。并且,在细胞中,DFX仅在相对高的浓度诱导HIF-1 α 稳定和激活。

[0012] 三萜系化合物广泛地分布在可食用的和药用的植物中,并且是人饮食的固有部分。其中,五环三萜系化合物由直链烃角鲨烯衍生,并且它们是高度多功能的,并且由此在农业、食品、化妆品和药物领域内具有宽泛的商业应用,作为杀虫剂、药物、辅剂、抗微生物剂、抗癌剂、表面活性剂、防腐剂等(Sheng等人, Nat. Prod. Rep. 2011 Mar; 28 (3) : 543-93; Yadav等人, Toxins (Basel) 2010 Oct; 2 (10) : 2428-66)。三萜系化合物的酸性官能团和羟基(-OH)基团不能以固定相相互作用,原因在于这两个基团位于该化合物的相对侧。存在三个主要的三萜家族: 齐墩果烷(oleane)、乌苏烷和羽扇烷三萜。在齐墩果烷家族中存在的主要三萜系化合物是齐墩果酸(oleanolic acid)、山楂酸、高根二醇和 β -香树素; 在乌苏烷家族中存在的是熊果酸和熊果醇; 并且在羽扇烷家族中存在的是羽扇醇、桦木醇和桦木酸(Yadav等人, Toxins (Basel) 2010 Oct; 2 (10) : 2428-66)。

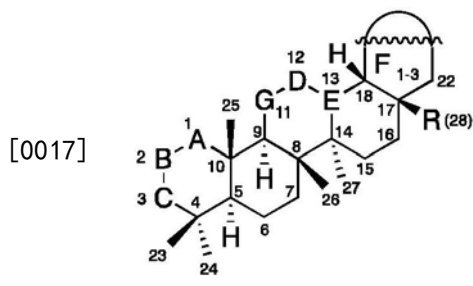
[0013] 已经广泛研究了饮食三萜系化合物,如齐墩果酸、熊果酸、桦木酸和山楂酸的生物活性和药物应用,并且它们也被广泛用作模板来制备具有提高的生物活性的新型衍生物。已表明三萜系化合物抑制转录因子NF- κ B(细胞核因子- κ B)和STAT3(信号转导及转录激活蛋白3)的激活,调节Nrf2(NFE2L2或细胞核因子(红细胞(erythroid)-来源的2)-样2)途径,并且结合和激活胆汁受体TGR5(Sato等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 2007 Nov 3; 362 (4) : 793-8)。然而,还没有记载三萜系化合物对PDH2抑制和HIF-1 α 稳定化的潜在活性。令人

惊讶地,熊果酸、桦木酸和齐墩果酸(它们是本文公开的化合物II至XIV的前体)结合PHD2,但是不激活HIF-1 α 途径。这一发现导致产生羟肟酸(hydroxamate)衍生物,其能够结合PHD2,螯合在其活性口袋中的Fe²⁺,并且因此这些化合物激活HIF途径并稳定HIF-1 α 与HIF-2 α 蛋白。化合物III,IV,V,VI,VIII,IX,X,XI,和XIV以及XV是新型的化学实体,而已报道化合物II,VII,XII和XIII在体外具有抗癌活性,其不与HIF-1 α 激活相关(Wiemann等人,Eur.J.Med.Chem.2015Dec 1;106:194-210;Wiemann等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.2016Feb 1;26(3):907-9;CN102180939B)。事实上,已经提示一些三萜系化合物的HIF-1 α 抑制作用(与HIF-1 α 激活相反)作为抗癌疗法的潜在策略(Dasgupta等人,Angiogenesis.2015Jul;18(3):283-99;Jin等人,Arch Pharm Res.2007Apr;30(4):412-8;Dai等人,J Nat Prod.2006Dec;69(12):1715-20)。

[0014] 简述

[0015] 不同于现有技术,本发明的问题是提供诱导HIF-1 α 和HIF-2 α 稳定化并激活HIF途径的新型五环三萜系化合物衍生物(三萜系化合物衍生物)。

[0016] 本发明涉及式(Ia)的三萜衍生物或立体异构体、药用盐或药用溶剂化物,



[0018] 其中独立地,

[0019] -A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

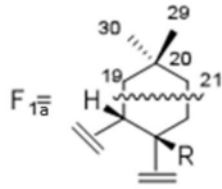
[0020] -B选自亚甲基(-CH₂-),烯次甲基(=CH-),羟基次甲基[-CH(OH)-],或羟基化烯碳[-C(OH)=];

[0021] -B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环;

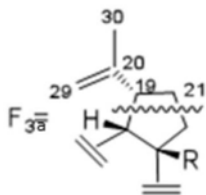
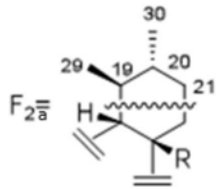
[0022] -C选自羟基次甲基[-CH(OH)-],酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-],烯次甲基(=CH-),羰基[-C(=O)-],肟[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-],其中R'是甲基;

[0023] -D-E是碳-碳单键或双键;

[0024] -F选自F_{1a},F_{2a}或F_{3a};



[0025]

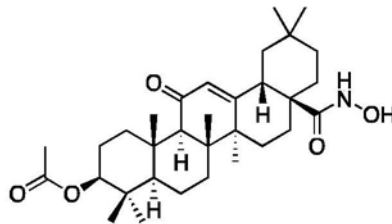
[0026] -G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];和

[0027] -R是氧肟酸基团(-CONHOH);

[0028] 并且其中

[0029] -当C为酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]时,式(Ia)的三萜衍生物为(V)

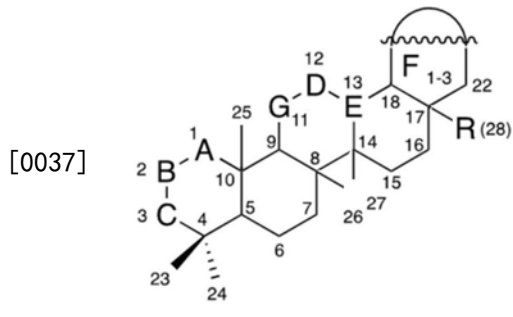
[0030]

**(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺;**[0031] -当B为亚甲基(-CH₂-)时,C是羟基次甲基[-CH(OH)-],D-E是碳-碳双键,G是亚甲基(-CH₂-),并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F是F_{3a};[0032] -当B是亚甲基(-CH₂-)时,C是羟基次甲基[-CH(OH)-],D-E是碳-碳单键,G是亚甲基(-CH₂-),并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F选自F_{1a}或F_{2a};[0033] -当B是亚甲基(-CH₂-)时,C是肟[-C(=N-OH)-],D-E是碳-碳双键,G是亚甲基(-CH₂-),并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F选自F_{1a}或F_{3a}。

[0034] 另外,本发明涉及包含至少一种作为第一活性成分的如本文上文所述的式(Ia)的三萜衍生物和至少一种赋形剂或载体的药物组合物,并且任选地还包含至少一种第二活性成分。

[0035] 本发明的另一方面涉及如本文上文所述的式(Ia)的三萜衍生物及其药物组合物,其用作药物。

[0036] 本发明还涉及式(I)的三萜衍生物或其立体异构体、药用盐或药用溶剂化物,



[0038] 其中独立的,

[0039] -A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

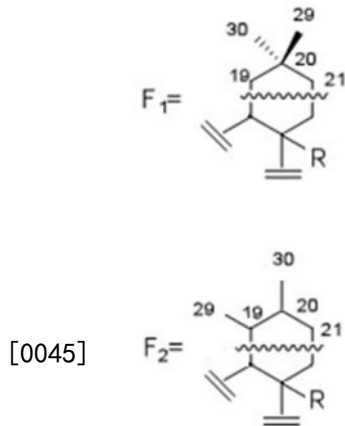
[0040] -B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

[0041] -B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分, 其中至少一个所述杂原子是氮;并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环;

[0042] -C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

[0043] -D-E是碳-碳单键或双键;

[0044] -F选自F₁, F₂或F₃;



[0046] -G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

[0047] -R是氧脞酸基(-CONHOH);

[0048] 其用于治疗响应于HIF途径的激活的病症或疾病的应用。

[0049] 本发明还涉及包含本文上文所述的三萜衍生物的药物组合物,其用于治疗响应于HIF途径的激活的病症或疾病。

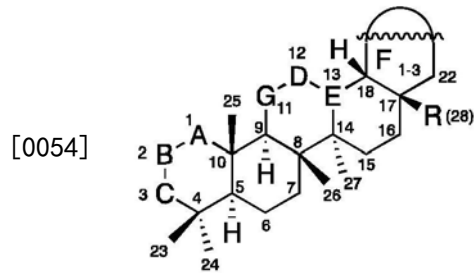
[0050] 发明详述

[0051] 本发明涉及在位置28包含氧脞酸官能团的三萜系化合物衍生物和包含所述三萜

系化合物衍生物的组合,其表现出结合PHD2、稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白、激活不同细胞类型中的HIF途径、诱导人内皮血管细胞中的血管发生、在体外和体内表现出神经保护活性、体内抗糖尿病活性和在体内提高红细胞生成素血浆水平的能力。

[0052] 所述三萜系化合物衍生物还以选择性方式作用并且不诱导Nrf2激活、NF- κ B抑制、STAT3抑制和TGR5激活,这些是它们天然三萜系化合物前体的已知活性。所述三萜系化合物衍生物可用于治疗响应于HIF途径激活的病症和或疾病。因此,本发明涉及其治疗受益于或响应于HIF-1 α 和HIF-2 α 激活的疾病,并且因此,本发明不涉及其治疗受益于或响应于HIF-1 α 抑制的疾病或病症。

[0053] 更具体地,本发明涉及式(Ia)的三萜衍生物:



[0055] 其中独立地,

[0056] -A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

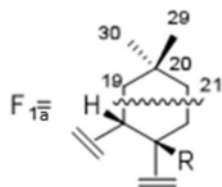
[0057] -B选自亚甲基(-CH₂-),烯次甲基(=CH-),羟基次甲基[-CH(OH)-],或羟基化烯碳[-C(OH)=];

[0058] -B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;

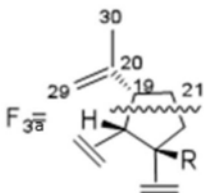
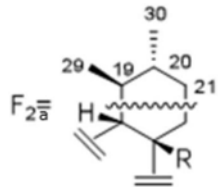
[0059] -C选自羟基次甲基[-CH(OH)-],酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-],烯次甲基(=CH-),羰基[-C(=O)-],脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-],其中R'是甲基;

[0060] -D-E是碳-碳单键或双键;

[0061] -F选自F_{1a}, F_{2a}和F_{3a};



[0062]



[0063] -G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

[0064] -R是氧肟酸基(-CONHOH);

[0065] 并且其中

[0066] -当B是亚甲基(-CH₂-)时,C是羟基次甲基[-CH(OH)-],D-E是碳-碳双键,并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F是F_{3a};

[0067] -当B是亚甲基(-CH₂-)时,C是羟基次甲基[-CH(OH)-],D-E是碳-碳单键,并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F选自F_{1a}或F_{2a};

[0068] -当B是亚甲基(-CH₂-)时,C是肟[-C(=N-OH)-],D-E是碳-碳双键,并且R是氧肟酸基(-CONHOH),F选自F_{2a}或F_{3a}。

[0069] 如本文上文公开的,在式(Ia)的三萜衍生物的一个实施方案中,B-C可以是包含一个或多个杂原子、其中至少一个所述杂原子是氮的杂环的一部分,并且其中所述杂环是五元环。

[0070] 如本文上文公开的,在式(Ia)的三萜衍生物的一个实施方案中,B-C可以是包含一个或多个杂原子、其中至少一个所述杂原子是氮的杂环的一部分,并且其中所述杂环是包含两个氮原子的五元环。

[0071] 如本文上文公开的,在式(Ia)的三萜衍生物的一个实施方案中,B-C可以是包含一个或多个杂原子、其中至少一个所述杂原子是氮的杂环的一部分,并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环。

[0072] 如本文上文公开的式(Ia)的三萜衍生物还包括其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物。

[0073] 就本说明书的目的而言,术语“一种/多种类似物”是指与本发明公开的化合物结构上衍生的或同源的任意实体。

[0074] 在本发明的情况下,术语本文公开的化合物的“一种/多种衍生物”应该解释为按

照本文上文R的定义总是在位置28取代的任意三萜系化合物类似物,其为所述三萜系化合物化合物提供本文所述的药理学特性,但是特征也在于在三萜系化合物分子其他位置的其他不同于本文所述的取代的取代。

[0075] 术语“互变异构体”是通过化学过程(互变异构)容易互变的有机化合物的结构异构体。

[0076] 术语“异构体”由IUPAC(国际纯粹和应用化学协会(International Union of Pure and Applied Chemistry))正式定义为数个种类(或分子实体)中的一个,所述种类(或分子实体)具有相同的原子组成(分子式)但是具有不同的分子式或不同的立体化学式,而“立体异构体”由IUPAC正式定义为这样的化合物,所述化合物具有相同的化学组成,但是关于原子或基团的空间排列不同。

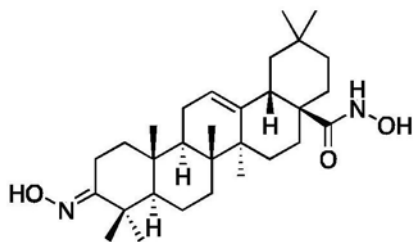
[0077] 用于本文时,“多晶型物”是指具有相同化学组成,但形成晶体的分子、原子和/或离子的空间排列不同的晶体。

[0078] 术语“药用盐”是指任意这样的药用盐,其在施用给患者后能够(直接或间接地)提供如本文中所述的化合物。这样的盐优选为与生理学可接受的有机或无机酸的酸加成盐。酸加成盐的实例包括无机酸加成盐,如,例如,盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐,和有机酸加成盐,如,例如,乙酸盐、三氟乙酸盐、马来酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐和对甲苯磺酸盐。碱加成盐的实例包括无机盐,如,例如,钠盐、钾盐、钙盐和铵盐,和有机碱盐,如,例如,乙二胺盐、乙醇胺盐、N,N-二亚烷基乙醇胺盐、三乙醇胺盐和碱性氨基酸盐。然而,应该理解,非药用盐也落在本发明的范围内,因为那些可以在药用盐的制备中 useful。盐形成的步骤在本领域中是常规的。

[0079] 根据本发明,术语“溶剂化物”应该理解为意为根据本发明的任何形式的活性化合物,其中所述化合物通过非共价键与另一分子(通常是极性溶剂)键合,其特别包括水合物和醇合物。

[0080] 在优选的实施方案中,所公开的三萜衍生物是指式(III),(IV),(V),(VI),(VIII),(IX),(X),(XI),(XIV),(XV)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物。

[0081] (III)

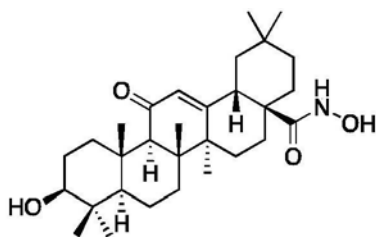


[0082]

3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

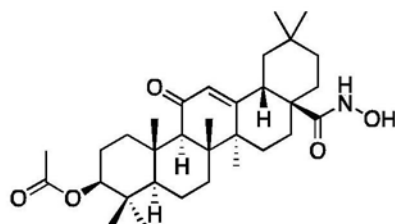
[0083] (IV)

[0084]

**(3β) 3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺**

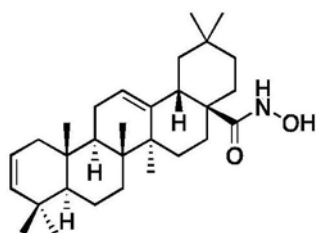
[0085] (V)

[0086]

**(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺**

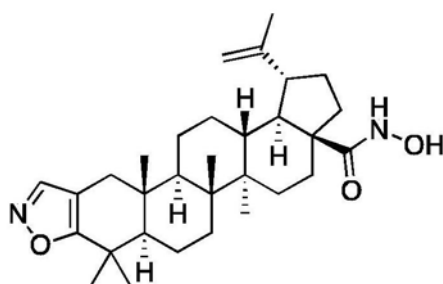
[0087] (VI)

[0088]

**齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺**

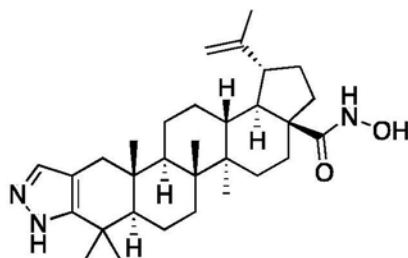
[0089] (VIII)

[0090]

**羽扇-2-烯并[2,3-d]异噁唑-N-羟基-28-酰胺**

[0091] (IX)

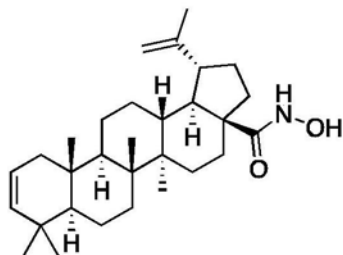
[0092]



1'H-羽扇-20(29)-烯并[3,2-c]吡唑-N-羟基-28-酰胺

[0093] (X)

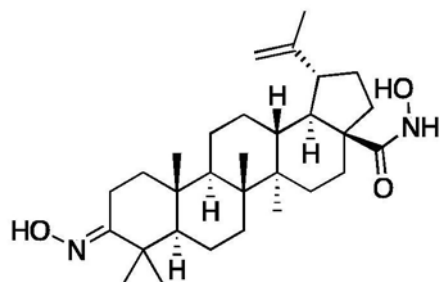
[0094]



羽扇-2,20(29)-二烯-N-羟基-28-酰胺

[0095] (XI)

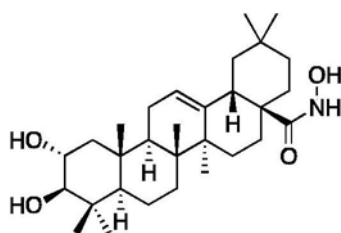
[0096]



3-氧代-羽扇-20(29)-烯-28-酸

[0097] (XIV)

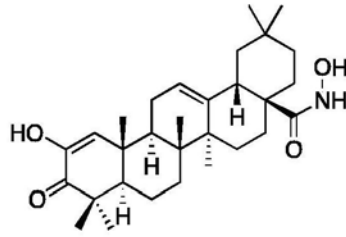
[0098]



(2 α ,3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺

[0099] (XV)

[0100]

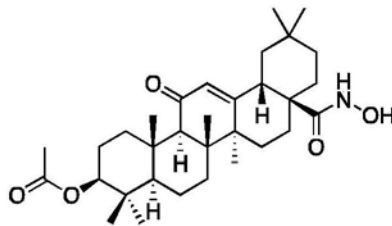


2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺

[0101] 在式 (Ia) 的三萜衍生物的优选的实施方案中, 当C是酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]时, 式 (Ia) 的三萜衍生物是

[0102] (V)

[0103]



(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺;

[0104] 如在本发明的实施例和附图中所示, 通式 (Ia) 中包括的修饰赋予本文公开的化合物下述能力: 结合PHD2、稳定HIF-1α和HIF-2α蛋白、激活不同细胞类型中的HIF途径、诱导人内皮血管细胞中的血管发生、在体外和体内表现出神经保护活性、体内抗糖尿病活性和在体内提高红细胞生成素血浆水平。所述的式 (Ia) 化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物以选择性方式作用, 并且不诱导Nrf2激活、NF-κB抑制、STAT3抑制和TGR5激活, 这些是它们天然的三萜系化合物前体的已知活性。

[0105] 本文公开的一个实施方案涉及组合物, 特别是药物组合物, 其至少包含如本文上文所述的式 (Ia) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物, 以及至少一种赋形剂或载体。

[0106] 就本发明的目的而言, 所述赋形剂或载体是指惰性成分, 诸如, 但不限于, 共溶剂, 表面活性剂, 油, 保湿剂, 润滑剂, 防腐剂, 稳定剂和抗氧化剂。可以使用任意的药理学可接受的缓冲液, 诸如TRIS或任意磷酸盐缓冲液。

[0107] 本文公开的另一个实施方案涉及组合物, 特别是药物组合物, 其至少包含如本文上文所述的式 (Ia) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物, 以及至少一种具有加和或增效的生物学活性的第二活性化合物。

[0108] 就本发明的目的而言, 术语“活性化合物或活性成分”应为被认为是同义的, 并且意为当施用给人或动物时发挥疗效的化学实体。

[0109] 本文公开的另一个实施方案涉及本发明式 (Ia) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物, 其用作药物。

[0110] 本文公开的另一个实施方案涉及本文以上所述的包含本发明式 (Ia) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的药物组合物,其用作药物。

[0111] 所述式 (Ia) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物表现出下述能力:结合PHD2,稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白,激活不同细胞类型中的HIF途径,诱导人内皮血管细胞中的血管发生,在体外和体内表现出神经保护活性,体内抗糖尿病活性,并且在体内提高红细胞生成素血浆水平。所述式 (Ia) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物以选择性方式作用并且不诱导Nrf2激活、NF- κ B抑制、STAT3抑制和TGR5激活,这些是它们天然的三萜系化合物前体的已知活性。

[0112] 所述式Ia的三萜系化合物衍生物及其药物组合物可用于治疗响应于HIF途径的激活的病症和疾病。

[0113] 因此,式 (Ia) 的三萜衍生物可用于响应于HIF途径的激活的病症或疾病,其中由此,所述病症或疾病的治疗受益于或响应于HIF途径的激活。

[0114] 根据本发明,响应于HIF途径的激活的病症和疾病不包括实体瘤。情况是这样的,因为实体瘤发展新生血管生成,其促进转移扩散,因此研发HIF-1抑制剂作为抗癌药,从而阻断异常的血管生长和功能(Potente等人Cell.2011Sep 16;146(6):873-87)。

[0115] 具体地,一个实施方案公开本文上述的式 (Ia) 的三萜衍生物及其药物组合物,其用于治疗各种各样的响应于HIF途径的激活的病症或疾病,所述病症或疾病包括,但不限于,卒中,脑瘫,创伤性损伤和神经变性疾病。神经变性疾病的实例包括,但不限于,多发性硬化,亨廷顿病,阿尔茨海默病(Alzheimer disease)或帕金森病(Parkinson disease)。

[0116] 就本说明书的目的而言,卒中是指脑血管病因的神经缺陷。卒中可以归类为两大类:缺血和出血。缺血性卒中由对脑血液供应的中断引起,而出血性卒中由血管破裂或异常的血管结构导致。

[0117] 就本说明书的目的而言,脑瘫是指一组永久性的运动障碍,其在幼童时期出现并且由控制运动、平衡和姿势的脑部分的异常发育或损害引起。

[0118] 就本说明书的目的而言,创伤性损伤是指突然发作和重度的物理损伤,其需要立即的医学护理。创伤性损伤是广泛多样的钝伤(blunt)、穿透伤和烧伤机制的结果。所述创伤性损伤包括机动车辆碰撞、运动损伤、摔倒、自然灾害和多种其他的物理损伤。

[0119] 另一个实施方案公开了本文上文所述的式 (Ia) 的三萜衍生物及其药物组合物,其用于治疗各种各样的响应于HIF途径激活的病症或疾病,其中所述病症或疾病包括,但不限于,IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,糖尿病性和慢性伤口,器官移植,急性肾损伤或动脉病。更优选地,所述病症或疾病选自IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,器官移植,急性肾损伤或动脉病。

[0120] 就本说明书的目的而言,IBD是指一组结肠和小肠的炎性病症。局限性肠炎和溃疡性结肠炎特别是炎性肠病的主要类型。

[0121] 就本说明书的目的而言,心肌缺血-再灌损伤是指当在心肌缺血或缺氧(缺氧、低氧)一段时间后对组织恢复血液供应时引起的组织损伤。

[0122] 就本说明书的目的而言,急性肺损伤是指这样的病症,其以急性严重的低氧为特

征,并且其诊断是基于病危患者中存在非心源性肺水肿和呼吸衰竭。

[0123] 就本说明书的目的而言,传染病是指由病原性微生物如细菌、病毒、寄生虫或真菌引起的疾病,并且其中所述疾病可以直接或间接地从一个人扩散到另一个人。

[0124] 就本说明书的目的而言,糖尿病性和慢性伤口是指这样的伤口,其可能由糖尿病病症引起,其不以大部分伤口愈合的方式在有序的一组阶段和可预期量的时间内愈合。一般来说,通常认为在三个月内没有愈合的伤口是慢性的。

[0125] 就本说明书的目的而言,急性肾损伤是指在7日内发展的由多种因素引起的突然的肾功能丧失。所述突然的肾功能丧失引起对肾组织的损害并且其通常由减小的肾血流(肾缺血)引起。

[0126] 就本说明书的目的而言,动脉疾病包括一类涉及血管的疾病。

[0127] 具体而言,一个实施方案公开本文所述的式(Ia)的化合物及其药物组合物,其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病,所述病症或疾病选自IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,糖尿病性和慢性伤口,器官移植,急性肾损伤或动脉病。在一个优选的实施方案中,所述响应于HIF途径激活的病症或疾病选自IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,器官移植,急性肾损伤或动脉病。

[0128] 本发明的一个实施方案还公开了本文上文所述的式(Ia)的化合物及其药物组合物,其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病,其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病是代谢病理学。在一个优选的实施方案中,所述代谢病理学是糖尿病。在另一个优选的实施方案中,所述代谢病理学是脂质代谢病症。在另一个优选的实施方案中,所述代谢病理学是高脂血症(hyperlipidemia)。在另一个优选的实施方案中,所述代谢病理学是高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia)。已经记载PHD2抑制剂改善葡萄糖和脂质代谢并且保护免于肥胖和代谢综合征(Rahtu-Korpela等人,Diabetes.2014Oct;63(10):3324-33)。

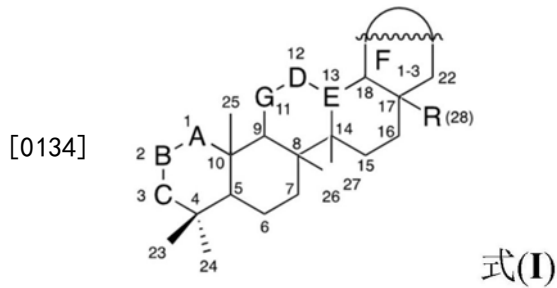
[0129] 术语“代谢病理学”是指其中正常的代谢过程已经改变的病理学。

[0130] 就本发明的目的而言,术语“糖尿病”是指一组在延长时间内存在高血糖水平的代谢病症。糖尿病是由于胰腺的低胰岛素产量或由于机体对所产生的胰岛素的不恰当的反应导致。

[0131] “高脂血症”是指这样的病症,其中受试者血液中存在异常升高水平的任意或全部的脂质或脂蛋白。

[0132] “高甘油三酯血症”是指这样的病症,其中受试者存在高血液水平的甘油三酯。升高水平的甘油三酯与动脉粥样硬化(atherosclerosis)相关,甚至在不存在高胆固醇血症(hypercholesterolemia)(高胆固醇水平)时也相关,并且倾向于引起心血管疾病。非常高的甘油三酯水平还增加急性胰腺炎的危险。

[0133] 本文公开的另一个实施方案是指式(I)的三萜衍生物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物,



[0135] 其中独立地，

[0136] -A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键；

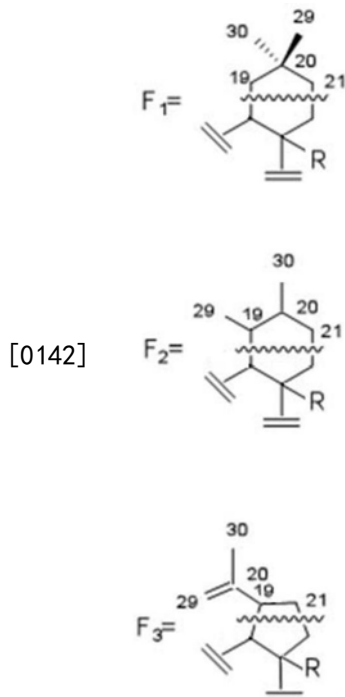
[0137] -B选自亚甲基(-CH₂-)，烯次甲基(=CH-)，羟基次甲基[-CH(OH)-]，或羟基化烯碳[-C(OH)=]；

[0138] -B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键；或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分，其中至少一个所述杂原子是氮；

[0139] -C选自羟基次甲基[-CH(OH)-]，酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]，烯次甲基(=CH-)，羰基[-C(=O)-]，脞[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-]，其中R'是甲基；

[0140] -D-E是碳-碳单键或双键；

[0141] -F选自F₁，F₂或F₃；



[0143] -G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-]；并且

[0144] -R是氧脞酸基(-CONHOH)；

[0145] 其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病。

[0146] 因此，式(I)的三萜衍生物可用于响应于HIF途径激活的病症或疾病，其中因此，所述病症或疾病的治疗受益于或响应于HIF途径的激活。

[0147] 如本文上文公开的式(I)的三萜衍生物还包含本文上文就本发明的目的而言定义的其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂

化物。具体地,本文上文公开的本发明式(I)的三萜衍生物包含其所有的立体异构体和任意的药用盐或药用溶剂化物。

[0148] 在本文上文公开的式(I)的三萜衍生物的一个实施方案中,B-C可以是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮,并且其中所述杂环是五元环。

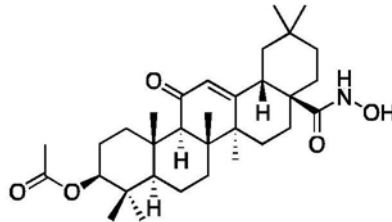
[0149] 在本文上文公开的式(I)的三萜衍生物的一个实施方案中,B-C可以是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮,并且其中所述杂环是包含两个氮原子的五元环。

[0150] 在本文上文公开的式(I)的三萜衍生物的一个实施方案中,B-C可以是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮,并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环。

[0151] 在式(I)的三萜衍生物的另一个实施方案中,当C是酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]时,式(I)的三萜衍生物为

[0152] (V)

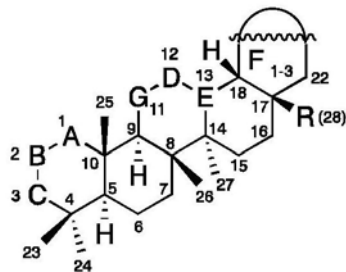
[0153]



(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺;

[0154] 式(I)的三萜衍生物的一个实施方案是指式(Ia)所示的其立体异构体:

[0155]



式(Ia)

[0156] 其中独立地

[0157] -A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

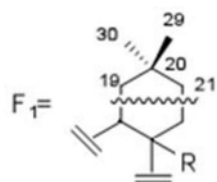
[0158] -B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

[0159] -B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分,其中至少一个所述杂原子是氮;

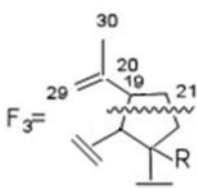
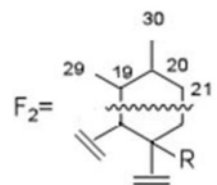
[0160] -C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 肟[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

[0161] -D-E是碳-碳单键或双键;

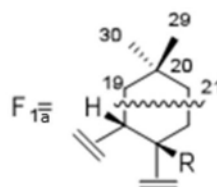
[0162] -F选自



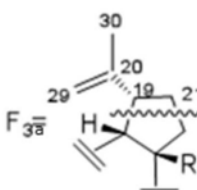
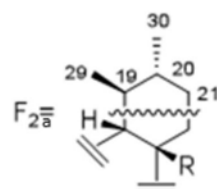
[0163]



[0164] 并且其中 F_1 是 F_{1a} , F_2 是 F_{2a} 并且 F_3 是 F_{3a} ;



[0165]



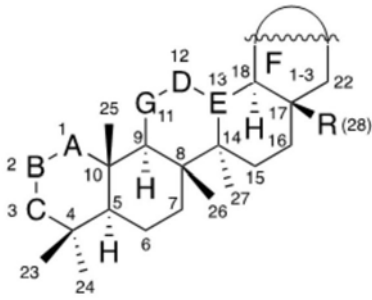
[0166] -G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

[0167] -R是氧肟酸基(-CONHOH);

[0168] 其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病。

[0169] 式(I)的三萜衍生物的另一个实施方案是指式(Ib)所示的其立体异构体:

[0170]



式(Ib)

[0171] 其中独立地,

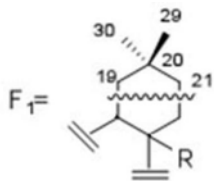
[0172] -A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

[0173] -B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

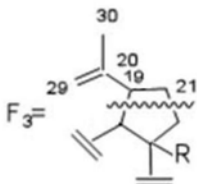
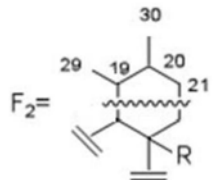
[0174] -B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分, 其中至少一个所述杂原子是氮;

[0175] -C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 脞[-C(=N-OH)-]或脲[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

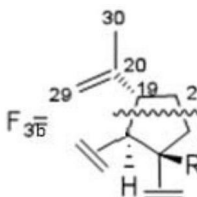
[0176] -D-E是碳-碳单键或双键;

[0177] -F选自F₁, F₂或F₃;

[0178]

[0179] 并且其中当F是F₃时, F₃是F_{3b}:

[0180]



[0181] 其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病。

[0182] 本发明所述的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物表现出下述能力:

[0183] -结合PHD2,如下文公开的实施例2所示,

[0184] -稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白,如下文公开的实施例4所示,

[0185] -激活不同细胞类型中的HIF途径,如下文公开的实施例3所示,

[0186] -诱导人内皮血管细胞中的血管发生,如下文公开的实施例5所示,

[0187] -在体外和体内表现出神经保护活性,如下文公开的实施例7所示,并且

[0188] -在体内提高红细胞生成素血浆水平,如下文公开的实施例6所示;

[0189] -表现出抗糖尿病活性和在体内降低脂质水平,如下文公开的实施例9所示。

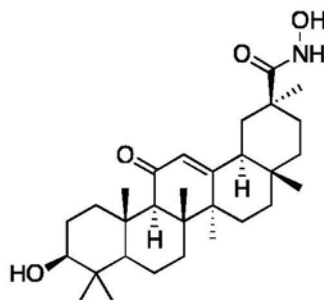
[0190] 所述三萜系化合物衍生物还以选择性方式作用,并且不诱导Nrf2激活、NF- κ B抑制、STAT3抑制和TGR5激活,这些是它们天然三萜系化合物前体的已知活性(如在本发明的实施例3中所示)。

[0191] 如上文提及的,本发明的实施例3表明式(I)的化合物在不同细胞型中怎样激活HIF途径。实施例3还检测了两种比较化合物XX和CDDO-ME。

[0192] 比较化合物XX,衍生自甘草亭酸(glycyrrhetic acid),其在位置20包含氧肟酸基,并且因此不像本发明的化合物那样在位置28包含氧肟酸基。

[0193] (XX)

[0194]

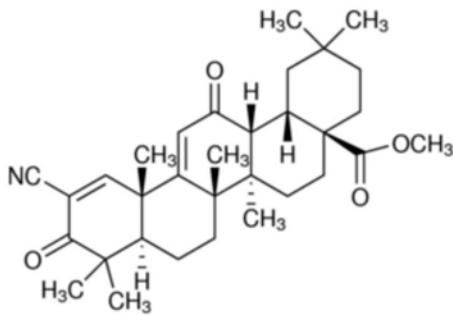


(3 β) 3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-29-酰胺

[0195] 实施例3的结果表明:氧肟酸基的位置从本发明化合物的特征位置28的变化导致不存在HIF途径的激活。

[0196] 另一方面,比较化合物CDDO-Me (2-氰基-3,12-二氧代-齐墩果-1,9(11)-二烯-28-酸甲酯,CAS编号218600-53-4)是齐墩果酸衍生物,但是其在位置2包含氰基(在式I的位置B的取代基),该取代基是与在本发明公开的式I的化合物的所述位置特有的取代基基本上不同的取代基。

[0197]



CDDO-Me

[0198] 实施例3的结果表明：CDDO-Me不提供HIF途径的激活，并且因此，不具有式I化合物的结构特征的比较化合物XX和CDDO-Me都不提供HIF途径的激活。

[0199] 因此，本发明公开的式I定义的三萜系化合物衍生物可用于治疗响应于HIF途径的激活的病症或疾病，即，其治疗受益于HIF-1 α 和HIF-2 α 激活的病症或疾病。

[0200] 具体而言，一个实施方案公开上文所述的式(I)的三萜衍生物，其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病，所述病症或疾病包括但不限于卒中、脑瘫、创伤性损伤和神经变性疾病。神经变性疾病的实例包括但不限于多发性硬化、亨廷顿病、阿尔茨海默病或帕金森病。

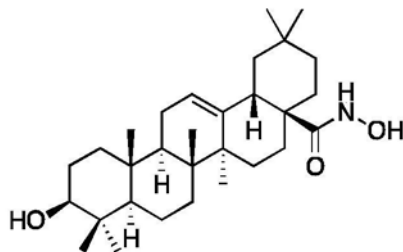
[0201] 另一个实施方案公开上文所述的式(I)的三萜衍生物，其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病，所述病症或疾病包括但不限于IBD，心肌缺血-再灌损伤，急性肺损伤，糖尿病性和慢性伤口，器官移植，急性肾损伤或动脉病。更优选地，所述病症或疾病选自IBD，心肌缺血-再灌损伤，急性肺损伤，器官移植，急性肾损伤或动脉病。

[0202] 本发明的一个实施方案还公开了上文所述的式(I)的化合物，其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病，其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病是代谢病理学。在优选的实施方案中，所述代谢病理学是糖尿病。在另一个优选的实施方案中，所述代谢病理学是脂质代谢病症。在另一个优选的实施方案中，所述代谢病理学是高脂血症。在另一个优选的实施方案中，所述代谢病理学是高甘油三酯血症。

[0203] 本文公开的另一个实施方案是指式(I)的化合物或其选自(II)，(III)，(IV)，(V)，(VI)，(VII)，(VIII)，(IX)，(X)，(XI)，(XII)，(XIII)，(XIV)或(XV)的类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物。

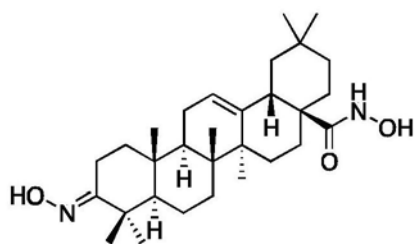
[0204] (II)

[0205]

**(3 β) 3-羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺**

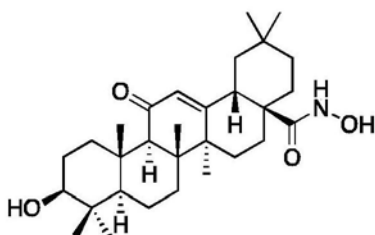
[0206] (III)

[0207]

**3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺**

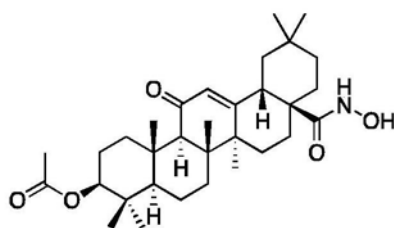
[0208] (IV)

[0209]

**(3β) 3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺**

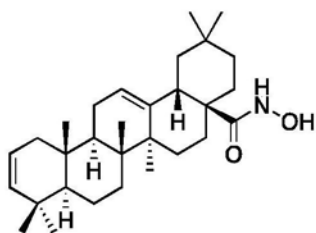
[0210] (V)

[0211]

**(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺**

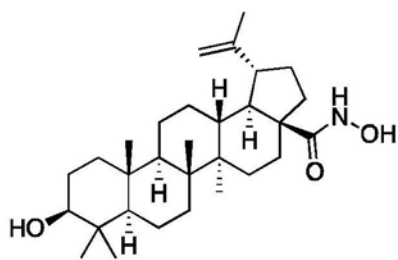
[0212] (VI)

[0213]

**齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺**

[0214] (VII)

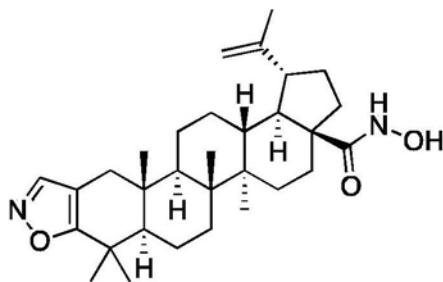
[0215]



(3β) 3-羟基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺

[0216] (VIII)

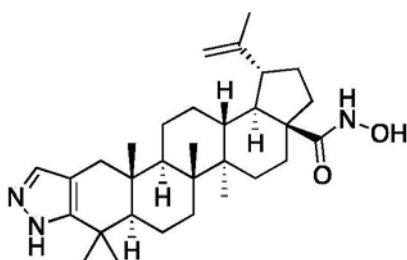
[0217]



羽扇-2-烯并[2,3-d]异噁唑-N-羟基-28-酰胺

[0218] (IX)

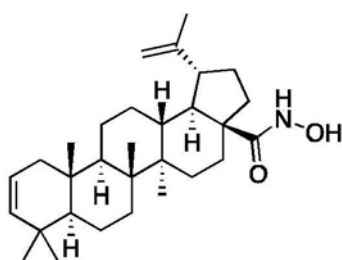
[0219]



1'H-羽扇-20(29)-烯并[3,2-c]吡啶-N-羟基-28-酰胺

[0220] (X)

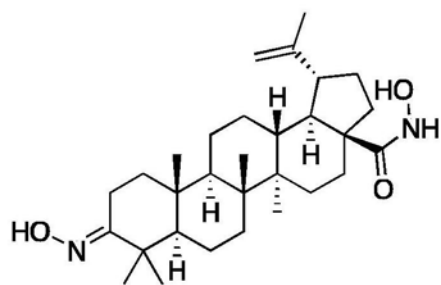
[0221]



羽扇-2,20(29)-二烯-N-羟基-28-酰胺

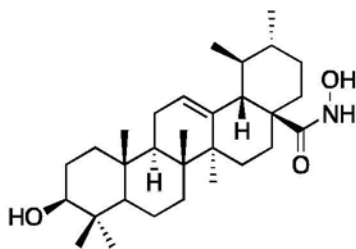
[0222] (XI)

[0223]

**3-羟基亚胺基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺**

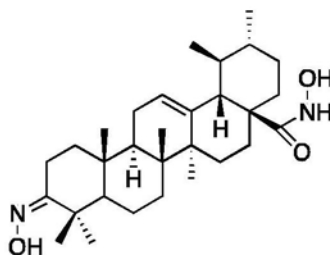
[0224] (XII)

[0225]

**(3 β) 3-羟基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺**

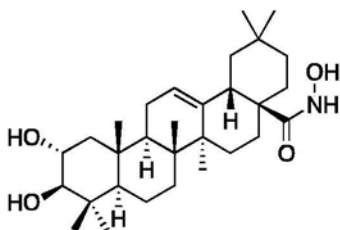
[0226] (XIII)

[0227]

**3 羟基亚胺基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺**

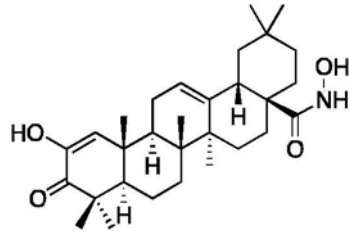
[0228] (XIV)

[0229]

**(2 α ,3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺**

[0230] (XV)

[0231]

[0232] **2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺**

[0233] 其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病。

[0234] 一个优选的实施方式是指式(I)的化合物或其选自(II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV)或(XV)的类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物,其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病。

[0235] 上文提及的化合物II至XV或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物表现出下述能力:结合PHD2,稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白,激活不同细胞类型中的HIF途径,诱导人内皮血管细胞中的血管发生,在体外和体内表现出神经保护活性,抗糖尿病活性和在体内降低脂质水平,以及在体内提高红细胞生成素血浆水平。所述式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物以选择性方式作用并且不诱导Nrf2激活、NF- κ B抑制、STAT3抑制和TGR5激活,这些是它们天然的前体的已知活性。

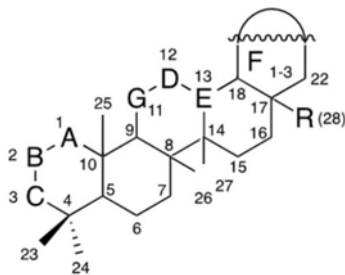
[0236] 如实施例1所示,从已知的天然三萜酸衍生物(桦木酸、齐墩果酸、熊果酸或山楂酸)或天然三萜酸本身起始,并且以通式(I)的化合物结束,使用常用的合成路线将位置28的酸基团转化成氧肟酸衍生物,其中,取决于式(I)的最终化合物的官能性,针对每种具体式(I)的化合物,进行其他另外的合成步骤。

[0237] 本发明的化合物III至VI可以从已知的天然齐墩果酸衍生物起始合成。本发明的化合物VIII至XI可以从天然桦木酸或其已知的衍生物起始合成。本发明的化合物XIV和XV可以从已知的天然山楂酸衍生物起始合成。

[0238] 实施例1还记载了化合物XVII和XVIII以及XIX,它们分别是化合物XV和XIV合成中的新型化合物中间体。

[0239] 本文公开的另一个实施方式是指药物组合物,其包含至少一种式(I)的三萜衍生物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物,

[0240]



式(I)

[0241] 其中独立的,

[0242] -A-B选自碳-碳单键或碳-碳双键;

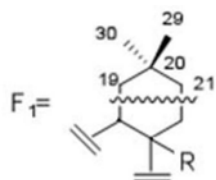
[0243] -B选自亚甲基(-CH₂-), 烯次甲基(=CH-), 羟基次甲基[-CH(OH)-], 或羟基化烯碳[-C(OH)=];

[0244] -B-C选自碳-碳单键或碳-碳双键;或是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分, 其中至少一个所述杂原子是氮;

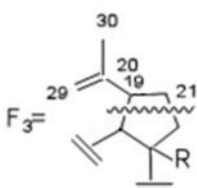
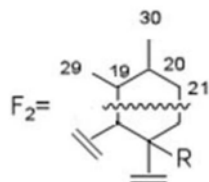
[0245] -C选自羟基次甲基[-CH(OH)-], 酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-], 烯次甲基(=CH-), 羰基[-C(=O)-], 肟[-C(=N-OH)-]或脞[-C(=N-NH₂)-], 其中R'是甲基;

[0246] -D-E是碳-碳单键或双键;

[0247] -F选自F₁, F₂或F₃;



[0248]



[0249] -G选自亚甲基(-CH₂-)或羰基[-C(=O)-];并且

[0250] -R是氧肟酸基(-CONHOH);

[0251] 其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病。

[0252] 在包含本文上文公开的式(I)的三萜衍生物的药物组合物的一个实施方案中, B-C可以是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分, 其中至少一个所述杂原子是氮, 并且其中所述杂环是五元环。

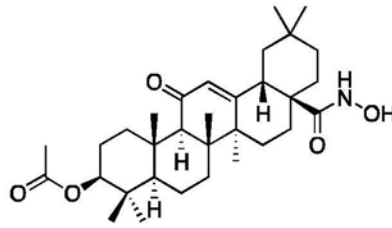
[0253] 在包含本文上文公开的式(I)的三萜衍生物的药物组合物的一个实施方案中, B-C可以是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分, 其中至少一个所述杂原子是氮, 并且其中所述杂环是包含两个氮原子的五元环。

[0254] 在包含本文上文公开的式(I)的三萜衍生物的药物组合物的一个实施方案中, B-C可以是包含一个或多个杂原子的杂环的一部分, 其中至少一个所述杂原子是氮, 并且其中所述杂环是包含一个氮和一个氧的五元环。

[0255] 在式(I)的三萜衍生物的一个实施方案中, 当C是酰氧基次甲基[-CH(OCOR')-]时, 式(I)的三萜衍生物是

[0256] (V)

[0257]



(3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺;

[0258] 所述包含式 (I) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的药物组合物表现出下述活性: 结合PHD2, 稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白, 激活不同细胞类型中的HIF途径, 诱导人内皮血管细胞中的血管发生, 在体外和体内表现出神经保护活性, 抗糖尿病活性和在体内降低脂质水平, 以及在体内提高红细胞生成素血浆水平。所述包含式 (I) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的组合物以选择性方式作用, 并且不诱导Nrf2激活、NF- κ B抑制、STAT3抑制和TGR5激活, 这些是它们天然的三萜系化合物前体的已知活性。

[0259] 本文公开的另一个实施方案是指包含至少一种上文所述的式 (I) 的三萜衍生物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的药物组合物, 其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病, 所述病症或疾病包括但不限于卒中、脑瘫、创伤性损伤和神经变性疾病; 或其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病, 所述病症或疾病包括但不限于IBD, 心肌缺血-再灌损伤, 急性肺损伤, 糖尿病性和慢性伤口, 器官移植, 急性肾损伤或动脉病。更优选地, 所述病症或疾病选自IBD, 心肌缺血-再灌损伤, 急性肺损伤, 器官移植, 急性肾损伤或动脉病。

[0260] 本文公开的另一个实施方案是指包含本文上文公开的至少一种式 (I) 的三萜衍生物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的药物组合物, 其用于治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病, 其中所述响应于HIF途径激活的病症或疾病是代谢病理学。在优选的实施方案中, 所述代谢病理学是糖尿病。在另一个优选的实施方案中, 所述代谢病理学是脂质代谢病症。在另一个优选的实施方案中, 所述代谢病理学是高脂血症。在另一个优选的实施方案中, 所述代谢病理学是高甘油三酯血症。

[0261] 所述组合物可以进一步包含另一种活性成分, 其在施用给人或动物时发挥治疗效果。

[0262] 典型的组合物包含本文上文所述的式 (I) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物, 其与药用赋形剂相关联, 例如, 所述药用赋形剂可以是载体或稀释剂。所述组合物可以是胶囊、小药囊、纸或其他容器的形式。在制备所述组合物时, 可以使用用于制备药物组合物的常规技术。例如, 上文公开的式 (I) 的化合物可以与载体混合, 或通过载体稀释, 或包封在载体中, 其可以以安瓿瓶、胶囊、小药囊、纸或其他容器的形式存在。当载体作为稀释剂时, 其可以是固体、半固体或液体材料, 作为活性化合物的媒介物、赋形剂或介质。上文所述的式 (I) 的化合物可以吸附在粒状固体容器中, 例如, 在小囊袋中。适当的载体的一些实例是水、盐溶液、醇、聚乙二醇、聚

羟基乙氧基化的蓖麻油、花生油、橄榄油、乳糖、白陶土、蔗糖、环糊精、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸或纤维素的低级烷基醚、硅酸、脂肪酸、脂肪酸胺、脂肪酸单甘油酯和甘油二酯、季戊四醇脂肪酸酯、聚氧乙烯、羟甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。类似地,载体或稀释剂可以包括本领域已知的任何缓释物质,诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,其单独使用或与蜡混合。所述组合物还可以包含湿润剂,乳化剂和混悬剂,防腐剂,甜味剂或调味剂。可以配制本发明的组合物,从而在通过使用本领域中公知的步骤施用给患者后提供本文公开的式(I)的化合物的快速、持续或延迟的释放。

[0263] 可以将药物组合物灭菌,并且如果需要,与辅助剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂和/或着色物质等混合,其不与上文公开的化合物有害地反应。

[0264] 本文公开的一个优选的实施方案涉及施用途径,其可以是有效转运上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物至适当的或所需的作用位点的任何途径,如口服、经鼻、局部、经肺、经皮或肠胃外,例如直肠、皮下、静脉内、尿道内、肌肉内、鼻内、眼用溶液或软膏。

[0265] 为了鼻施用,所述组合物可以含有溶解或悬浮在液体载体,特别是水性载体中的上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物,用于气溶胶应用。载体可以含有添加剂如增溶剂,例如丙二醇,表面活性剂,吸收促进剂如卵磷脂(磷脂酰胆碱),或环糊精,或防腐剂如对羟苯甲酸酯类(parabens)。

[0266] 为了制备局部制剂,将上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物置于本领域中已知的皮肤媒介物中。要施用的上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的量和局部制剂中化合物的浓度取决于媒介物、选择的递送系统或装置、患者的临床状况、副作用和制剂中化合物的稳定性。因此,医生使用含有适当浓度的上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的适当的制剂,并且选择要施用的制剂的量,这取决于讨论的患者或类似的患者的临床体验。

[0267] 为了眼用,将上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物配制为适于在眼中使用的溶液、悬浮液和软膏。浓度通常如上文对于局部制剂讨论的。

[0268] 为了口服施用,可以制备固体或液体单位剂型。为了制备固体组合物如片剂,将上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物与作为药物稀释剂或载体的常规成分如滑石、硬脂酸镁、磷酸二钙、硅酸镁铝、硫酸钙、淀粉、乳糖、阿拉伯胶、甲基纤维素,和功能类似的材料混合成制剂。

[0269] 通过将上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物与惰性药物稀释剂混合并且将混合物装入适当尺寸的硬明胶胶囊中来制备胶囊。通过将式(I)的化合物与可接受的植物油、轻液体矿物油或其他惰性油的浆液机械封装入胶囊制备软明胶胶囊。可以制备用于口服施用的液体单位剂型如糖浆、酞剂和混悬剂。水溶形式可以与糖、芳香调味剂和防腐剂一起溶解在水性媒

介质中以形成糖浆。通过使用水醇的 (hydroalcoholic) (例如, 乙醇) 媒介物与合适的甜味剂如糖和糊精, 连同芳香调味剂制备酞剂。可以利用水性媒介物, 在悬浮剂如阿拉伯胶、黄芪胶、甲基纤维素等的帮助下制备混悬剂。

[0270] 用于肠胃外使用的适当的组合物对于普通技术人员来说是明显的, 如使用合适的可注射溶液或混悬液。无菌组合物适于各种局部或肠胃外途径, 包括皮内、肌肉内、血管内和皮下。

[0271] 除了上文公开的式 (I) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物, 取决于组合物和所需递送模式, 所述组合物可以包括药用、非毒性载体或稀释剂, 其包括通常用于形成用于动物或人施用的药物组合物的媒介物。选择稀释剂从而不会不适当地影响组合的生物活性。

[0272] 特别用于可注射制剂的这样的稀释剂的实例是水、各种盐水、有机或无机盐溶液、Ringer's 溶液、葡萄糖溶液和Hank's 溶液。此外, 药物组合物或制剂可以包括添加剂如其他载体; 辅剂; 或无毒、非治疗性、非免疫原性稳定剂等。

[0273] 此外, 赋形剂可以包括在公开的组合物中。实例包括共溶剂、表面活性剂、油、保湿剂、润滑剂、防腐剂、稳定剂和抗氧化剂。可以使用任何药理学可接受的缓冲液, 例如tris或磷酸盐缓冲液。稀释剂、添加剂和赋形剂的有效量是有效获得关于溶解度、生物活性等的药用制剂的那些量。

[0274] 上文公开的式 (I) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物可以并入微球中。上文公开的式 (I) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物可以加载入白蛋白微球中, 由此可能将该微球恢复在干粉中用于鼻内施用。其他适于制备微球的材料包括琼脂、藻酸盐、壳聚糖、淀粉、羟基乙基淀粉、白蛋白、琼脂糖、葡聚糖、透明质酸、明胶、胶原蛋白和酪蛋白。微球可以通过本领域技术人员已知的各种方法制造, 如喷雾干燥方法或乳化方法。

[0275] 例如, 可以通过将磷酸缓冲液中的兔血清白蛋白加入橄榄油中并搅拌以产生油包水乳状液来制备白蛋白微球。然后将戊二醛溶液加入至乳状液中, 并将乳状液搅拌以交联白蛋白。然后通过离心将微球分离, 去除油并且例如用石油醚洗涤球, 接着用乙醇洗涤。最后, 可以将微球过筛并收集并通过过滤干燥。

[0276] 可以通过将温的淀粉水溶液, 例如马铃薯淀粉的水溶液加入至热的聚乙二醇的水溶液, 并搅拌以形成乳状液来制备淀粉微球。当形成两相 (淀粉溶液作为内部相) 体系时, 然后在连续搅拌下将混合物冷却至室温, 此时内部相转变为凝胶颗粒。然后在室温将这些颗粒过滤掉, 并在溶剂如乙醇中成浆, 这之后再次将颗粒滤去并在空气中放置至干燥。微球可以通过公知的交联步骤如热处理或通过使用化学交联剂硬化。合适的试剂包括二醛, 包括乙二醛、丙二醛、丁二醛、己二醛、戊二醛和苯二醛, 二酮如丁二酮, 表氯醇, 多磷酸盐和硼酸盐。二醛用于通过与氨基相互作用来交联蛋白如白蛋白, 并且二酮与氨基形成希夫碱。表氯醇利用亲核试剂如氨基或羟基活化化合物以得到环氧化物衍生物。

[0277] 本发明的另一优选的实施方案是上文所述的式 (I) 的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物以及包含所述化合物的组合物的剂量方案。术语“单位剂型”是指适合作为用于受试者, 例如, 哺乳动物受试

者,例如人、狗、猫和啮齿类动物的单一剂量的物理上分离的单位,各个单位含有与所要求的药物稀释剂、载体或媒介物关联的预定量的活性物质,所述活性物质的预定量计算为产生所需药效。用于本发明的单位剂型的规格(specifications)受控于并且依赖于:(a)上文公开的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物的独特特性和要获得的特别效果和(b)将所述式(I)的化合物配料用在人和动物中的领域中固有的限制。单位剂型的实例是片剂、胶囊、丸剂、粉末包、薄饼(wafer)、栓剂、颗粒、扁囊剂、茶匙、汤匙、滴剂(dropperfuls)、安瓿、小瓶、计量释放的气溶胶、前述任一项的隔离的多次量、和本文中所述的其他形式。本文公开的组合物可以包括在试剂盒中,所述试剂盒可以含有一种以上单位剂型的组合物和用于治疗本文所述的一种以上疾病的使用说明。

[0278] 缓慢或延长释放递送系统,包括很多生物聚合物(基于生物的系统)、使用脂质体的系统、胶体、树脂和其他多聚递送系统或隔室化的储库中的任一种,可以与本文中所述的组合物一起使用以提供治疗性化合物的连续或长期来源。这样的缓慢释放系统可用于经局部、眼内、口服和肠胃外途径递送的制剂。

[0279] 所述组合物中包含有效量的上文所述的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物。根据本发明使用的化合物的剂量根据化合物和治疗的状况例如接受者患者的年龄、体重和临床状况而改变。其他因素包括:施用途径、患者、患者的医疗史、疾病过程的严重度和具体的化合物的效力。剂量应该足以缓解治疗的疾病的症状或征兆,而不对患者产生不可接受的毒性。通常,有效量的化合物是提供由临床医师或其他有资质的观察者注意的主观的症状减轻或客观的可鉴定的改善的量。

[0280] 本文公开的一个实施方案涉及使用式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病的方法。

[0281] 所述式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物表现出下述能力:结合PHD2,稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白,激活不同细胞类型中的HIF途径,诱导人内皮血管细胞中的血管发生,在体外和体内表现出神经保护活性,抗糖尿病活性和在体内降低脂质水平,以及在体内提高红细胞生成素血浆水平。所述式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物以选择性方式作用并且不诱导Nrf2激活、NF- κ B抑制、STAT3抑制和TGR5激活,这些是它们天然的三萜系化合物前体的已知活性。

[0282] 本文公开的另一个实施方案涉及使用式(I)的化合物治疗响应于HIF途径激活的疾病的方法,所述疾病诸如IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,糖尿病性和慢性伤口,器官移植,急性肾损伤或动脉病。在优选的实施方案中,所述疾病选自IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,器官移植,急性肾损伤或动脉病。

[0283] 本文公开的另一个实施方案涉及使用式(I)的化合物治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病的方法,所述病症或疾病选自卒中、脑瘫、创伤性损伤或神经变性疾病。

[0284] 本文公开的一个实施方案涉及治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病的方法,所述病症或疾病选自IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,糖尿病性和慢性伤口,器官移植,

急性肾损伤或动脉病,所述方法包括向需要所述治疗的个体施用有效量的上文所述的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物。在优选的实施方案中,所述疾病选自IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,器官移植,急性肾损伤或动脉病。

[0285] 本文公开的另一个实施方案涉及治疗响应于HIF途径激活的病症或疾病的方法,所述所述包括向需要所述治疗的个体施用有效量的上文所述的式(I)的化合物或其类似物、衍生物、互变异构体形式、异构体、立体异构体、多晶型物、药用盐或药用溶剂化物。

[0286] 在本文公开的一个实施方案中,响应于HIF途径激活的病症或疾病包括但不限于卒中,脑瘫,创伤性损伤和神经变性疾病。神经变性疾病的实例包括但不限于阿尔茨海默病,帕金森病,亨廷顿病或多发性硬化。

[0287] 附图简述

[0288] 图1. 与PHD2结合的桦木酸(图1A)和化合物VII(图1B)的高评分构象(PDB 4BQW)。

[0289] 图2. 在HaCaT-EPO-Luc角质形成细胞中的HIF-1 α 反式激活测定。

[0290] 在HaCaT-EPO-Luc细胞中DFX和化合物II至XV的低氧模拟作用。测试的化合物的浓度(μ M)显示在x-轴上,并且HIF-1 α 激活的百分数显示在y-轴上。该图显示DFX相对于化合物(图2A) II, III, IV, V, VI, VII, XI, (图2B) VIII, IX, X, XII, XIII, XIV和XV对EPO-luc活性的作用,将由DFX(150 μ M)介导的诱导视为相对于未处理细胞的100%激活。

[0291] 图3. 在少突胶质细胞中的HIF-1 α 稳定化。

[0292] 用150 μ M DFX或10 μ M齐墩果酸(OA),化合物II, III, IV, V, VI(图3A),桦木酸(BA),化合物VII, VIII, IX, X, XI(图3B),熊果酸(UA),山楂酸(MA),化合物XII, XIII, XIV和XV(图3C)刺激人少突胶质细胞M013.3细胞3小时,以通过蛋白质印迹确定HIF-1 α 和 β -肌动蛋白的表达。

[0293] 图4. 在293T细胞中的HIF-1 α 稳定化。

[0294] 在3小时期间用增加浓度的化合物VII或用DFX(150 μ M)刺激人胚肾293细胞。通过蛋白质印迹确定蛋白HIF-1 α 、PHD1、PHD2和 β -肌动蛋白的稳定状态水平。

[0295] 图5. 在hIPC中的HIF-2 α 稳定化。

[0296] 在3小时期间用增加浓度的化合物VII或用DFX(150 μ M)刺激人胰岛来源的前体细胞(hIPC),并且通过蛋白质印迹确定HIF-2 α 、PHD3和 β -肌动蛋白的表达。

[0297] 图6. 化合物VII诱导血管生成。

[0298] 在与原代成纤维细胞共同培养并分别用化合物VII(1 μ M)、rhFGF(10ng/ml)和VEGFA(10ng/ml)刺激7天的绿色荧光人内皮血管细胞(HUVEC)中,测量内皮细胞管形成,其作为血管生成模型。值表示平均值 \pm SEM(n=3)。

[0299] 图7. 在体内化合物VII对红细胞生成素(EPO)的影响。

[0300] 使用小鼠EPO ELISA试剂盒,测量腹膜内施用了化合物VII(30mg/kg或60mg/kg)或桦木酸(BA)(60mg/kg)的C57BL/6雄性小鼠血浆中的EPO。对照组没有接受任何处理。数据表示为平均值 \pm SEM(n=3)。

[0301] 图8. 在Q7和Q11纹状体细胞中,化合物VII消除3-NP毒性。将Q7和Q111纹状体细胞用增加浓度的化合物VII预处理6小时,然后暴露于3-NP(10mM)另外的24小时,之后利用YOYO-1染色来研究细胞死亡。使用IncuCyte HD软件确定细胞死亡,并且将在Q111细胞中仅

用3-NP处理视为100%的细胞死亡。

[0302] 图9. 3NP中毒后的行为评分。

[0303] 使3-硝基丙酸(3-NP)中毒的小鼠进行行为测试,以确定在用化合物VII(30mg/kg)和桦木酸(BA)(30mg/kg)处理后相对于未中毒的小鼠对照它们的神经学状况。基于严重性,对后肢抱握、运动活动、后肢张力障碍和躯干张力障碍按0-2分级:评分0通常表示正常功能,2表示严重影响。值表示为每组6只动物的平均值 \pm SEM。

[0304] 图10. 化合物VII对神经元损失的影响。

[0305] 用3-硝基丙酸(3-NP)中毒的小鼠用于确定纹状体中的变性,包括对照(未中毒的小鼠),3NP,3NP+BA和3NP+化合物VII)。小鼠纹状体中Nissl-阳性细胞的定量。显示了神经元的总平均数(放大100倍)。值表示为每组6只动物的平均值 \pm SEM。数据进行单向方差分析,然后进行Student-Newman-Keuls检验。当比较对照组与3NP和对照组时,*** $P < 0.001$ 。当比较3NP组与3NP+化合物VII组时,[#] $P < 0.05$ 。

[0306] 图11. 化合物VII对3NP诱导的小胶质细胞增生(Iba1⁺)和星形胶质细胞增生(GFAP⁺)的作用

[0307] 用3-硝基丙酸(3-NP)中毒的小鼠用于确定小胶质细胞激活和小胶质细胞增生,包括对照(未中毒的小鼠),3NP,3NP+BA和3NP+化合物VII)。通过对来自不同组小鼠的脑切片免疫染色来确定Iba-1和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)表达,并且使用Image J软件进行不同标记的定量。显示了小胶质细胞(Iba1⁺)和星形胶质细胞(GFAP⁺)的总平均数。

[0308] 图12. 化合物VII减少纹状体中炎症标记mRNA的表达。

[0309] 与3NP+媒介物小鼠相比,在3NP+化合物VII(30mg/kg)处理的小鼠中,包括COX-2(图12D)、IL-1 β (图12B)、IL-6(图12A)和iNOS(图12C)的炎症标记的基因表达被下调。桦木酸(BA)处理(30mg/kg)也抑制炎症标记的表达。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算表达水平。值表示为每组6只动物的平均值 \pm SEM。

[0310] 图13. 化合物VII对进行高脂肪饮食的小鼠(HFD动物)的体重、脂肪量和肥胖的影响。

[0311] 将小鼠用HFD喂养13周,并每日用化合物VII(30mg/Kg)处理21天,每3-4天监测对体重的影响(图13A)。 $\%$ 瘦肉量(图13B)计算为没有脂肪部分的总体重的比例。 $\%$ 脂肪量(图13C)计算为脂肪与总体重的比例。在第15周计算脂肪量和肥胖百分数。通过磁共振成像(MRI)评估身体组成。值表示为每组10只动物的平均值 \pm SEM。

[0312] 图14. 化合物VII改善HFD动物中的葡萄糖耐量(GTT)。

[0313] 3周媒介物(对照,CD)或化合物VII施用(30mg/Kg)后HFD-喂养的小鼠的GTT。将与每只动物相对应的在0,15,30,45,60,90和120分钟时间点之间的梯形面积和求和,以得到曲线下面积(AUC)。相对面积值表示为相对于媒介物组的平均AUC(将其定义为100%)的百分数。值表示为平均值 \pm S.E.M(n=6)。

[0314] 图15. 化合物VII预防HFD动物中的高甘油三酯血症。

[0315] 3周媒介物(对照,CD)或化合物VII施用(30mg/Kg)后对照和HFD-喂养的小鼠中的血浆甘油三酯水平。值表示为平均值 \pm S.E.M(n=6)。

实施例

[0316] 下文所述的本发明的实施例目的在于举例说明其优选的实施方案,而不是限制其保护范围。

[0317] 实施例1.合成式(I)的三萜系化合物衍生物和比较化合物XX。

[0318] 式(I)的N-羟基-三萜-28-酰胺衍生物的一般合成(氧肟酸形成):

[0319] 向在无水二氯甲烷(DCM)中的三萜酸前体(1eq/mol)的冰冷溶液中,逐滴加入草酰氯(6eq/mol),并将混合物在40°C加热1,5小时。在真空中去除溶剂,将残余物溶解在无水吡啶或N,N-二异丙基乙胺(DiPEA)中,并加入氯化羟铵(6eq/mol)。将反应物在40°C加热3小时,用2N H₂SO₄溶液猝灭,并且用EtOAc萃取。有机相用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并在真空中挥发。在硅胶上纯化粗制化合物。

[0320] 可能的话,利用其CAS编号标记已知的化合物。

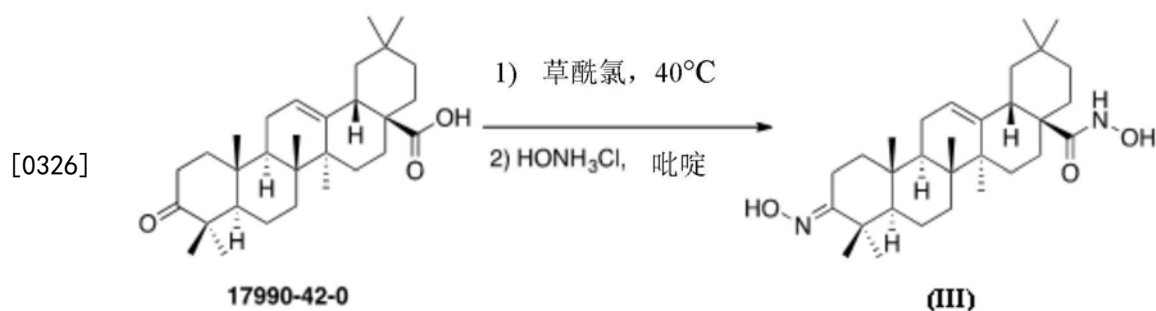
[0321] (3β) 3-羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺(化合物II)

[0322] CAS编号:1854922-22-7

[0323] 灰白色固体(60%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):d=5.41(brt,1H,H-12),3.19(dd,J=10.0,4.89Hz,1H),2.44(d,J=10.8Hz,1H),2.05-1.86(m,3H),1.16(s,3H),0.98(s,3H),0.92(s,3H),0.90(s,3H),0.88(s,3H),0.81(s,3H),0.78(s,3H)(仅报告了容易的峰);¹³C NMR(75MHz,CDCl₃):d=176.7,144.9,123.9,78.9,55.2,47.6,46.4,45.5,42.0,40.8,39.5,38.8,38.6,37.0,34.0,32.9,32.3,32.0,30.7,28.1,27.3,27.2,25.84,23.7,23.6,23.5,18.3,16.7,15.6,15.4。

[0324] 3-羟基亚胺基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺(化合物III)

[0325] 按照本文上文所述的一般合成方案(氧肟酸形成),从已知的前体CAS编号17990-42-0起始,得到化合物III:

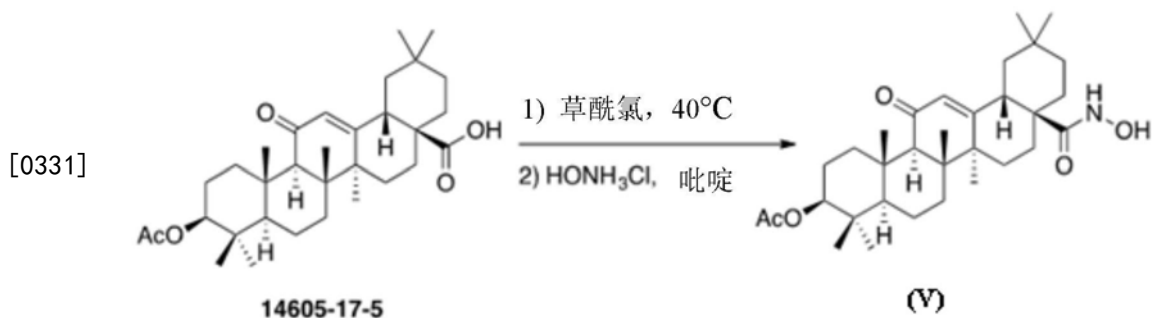


[0327] 在相同的一般合成路径中进行化合物III位置C特有的肟形成以及氧肟酸形成。

[0328] 灰白色固体(70%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):d=5.43(brt,1H),3.07(bdt,J=14.9,1H),2.46(m,1H),1.98(m,3H),1.13(s,10H),1.07(s,6H),1.05(s,3H),0.86(s,6H),0.82(s,3H)(仅报告了容易的峰);¹³C NMR(75MHz,CDCl₃)d=176.7,167.5,144.9,123.8,55.7,47.1,46.2,45.5,42.0,40.8,40.3,39.4,38.4,37.0,33.9,32.9,31.9,30.7,29.7,29.2,27.2,25.7,25.5,23.7,23.5,23.4,19.0,17.3,16.7,14.9。

[0329] (3β) 3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺(化合物V)

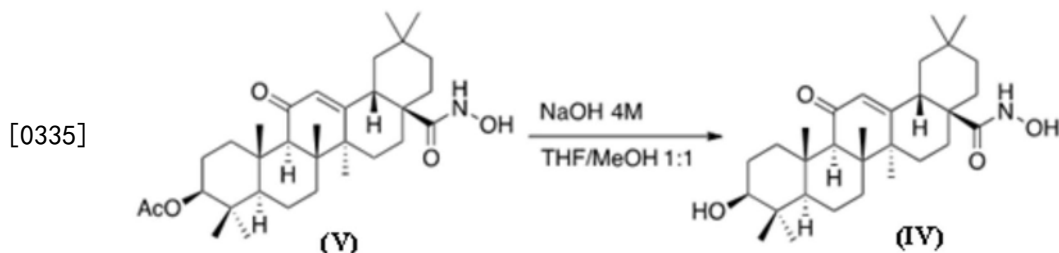
[0330] 按照本文上文所述的一般合成方案(氧肟酸形成),从已知的前体CAS编号14605-17-5得到化合物V。



[0332] 浅黄色固体 (75%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) : d=5.65 (s, 1H), 4.47 (dd, J=4.8J=11.0Hz, 1H), 3.31 (m, 1H), 2.76 (t, J=12.5Hz, 2H), 2.32 (s, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 6H), 0.82 (s, 9H) (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) d=200.5, 174.4, 171.2, 168.4, 127.8, 80.7, 61.9, 55.0, 45.3, 44.8, 43.6, 43.0, 40.7, 38.7, 38.0, 37.1, 33.8, 32.8, 32.6, 32.1, 30.7, 28.1, 27.3, 23.6, 23.5, 23.4, 23.1, 21.3, 19.0, 17.3, 16.7, 16.3。

[0333] (3β)-3-羟基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺 (化合物IV)

[0334] 为了得到化合物IV,按下述进行化合物V的去乙酰化:

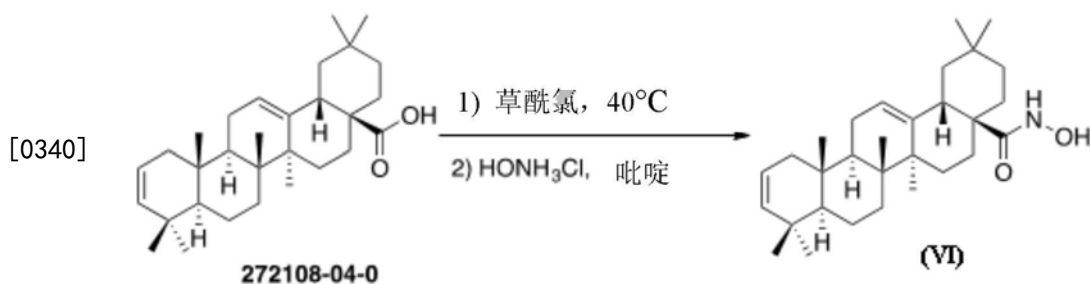


[0336] 向化合物V, (3β)-3-乙酰氧基-11-氧代-齐墩果-12-烯-N-羟基-28-酰胺 (1eq/mol) 在THF/MeOH 1:1中的溶液中,加入NaOH 4N (50eq/mol)。将混合物在40°C加热过夜,用2N H₂SO₄溶液猝灭,并用EtOAc萃取。将有机相用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,并在真空中挥发。在硅胶上纯化粗制化合物。

[0337] 浅黄色固体 (65%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) : d=5.67 (s, 1H), 3.20 (t, J=6.1Hz, 1H), 2.74 (d, J=12.2Hz, 2H), 2.32 (s, 1H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.18 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.77 (s, 3H) (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) d=200.2, 175.8, 167.9, 128.0, 78.8, 62.1, 55.0, 45.2, 44.7, 43.6, 40.9, 39.2, 37.3, 33.7, 32.8, 32.7, 32.1, 30.7, 29.7, 28.1, 27.4, 27.3, 23.7, 23.4, 23.3, 19.0, 17.5, 16.2, 15.6, 14.2。

[0338] 齐墩果-2,12-二烯-N-羟基-28-酰胺 (化合物VI)

[0339] 按照本文上文所述的一般合成方案(氧肟酸形成),从已知的前体CAS编号272108-04-0起始,得到化合物VI:



[0341] 黄色油 (48%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) : d=5.43-5.32 (m, 3H), 2.44 (d, J=11.3Hz, 1H), 1.14 (s, 3H), 0.97 (s, 6H), 0.87 (s, 12H) (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) d=176.4, 144.5, 138.0, 124.1, 121.3, 51.9, 46.4, 46.1, 45.5, 42.1, 41.0, 40.7, 39.5, 36.1, 34.5, 34.0, 33.0, 31.9, 31.8, 31.6, 30.7, 27.2, 25.9, 25.7, 23.8, 23.5, 22.9, 19.6, 16.3, 15.6。

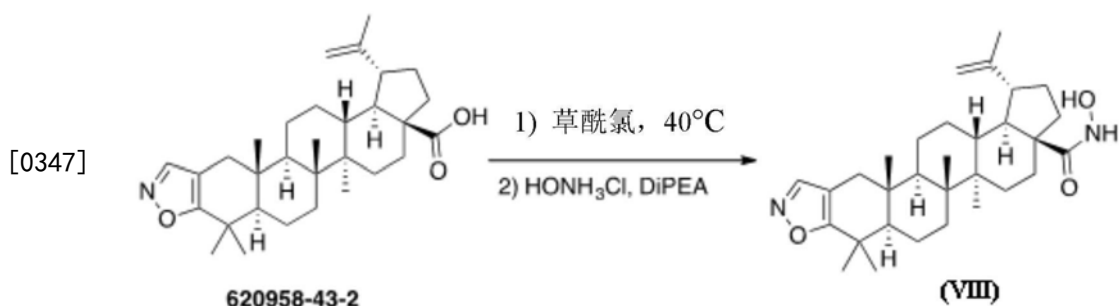
[0342] (3β)-3-羟基-N-羟基-羽扇-20(29)-烯-28-酰胺 (化合物VII)

[0343] CAS编号: 1822375-07-4

[0344] 灰白色固体 (55%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) : d: 4.73 (s, 1H), 4.60 (s, 1H), 3.20-3.15 (m, 1H), 3.05 (ddd, J=11.4, 6.4, 4.49Hz, 1H), 1.67 (s, 3H), 0.95 (s, 6H), 0.92 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.74 (s, 3H) (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) : d: 175.2, 150.9, 108.5, 78.4, 55.7, 54.3, 50.8, 50.7, 46.7, 42.3, 40.7, 38.7, 38.2, 37.8, 37.1, 36.9, 34.3, 32.6, 30.7, 29.3, 27.8, 26.9, 25.5, 20.8, 19.2, 18.2, 16.0, 15.9, 15.2, 14.5。

[0345] 羽扇-2-烯并[2,3-d]异噁唑-N-羟基-28-酰胺 (化合物VIII)

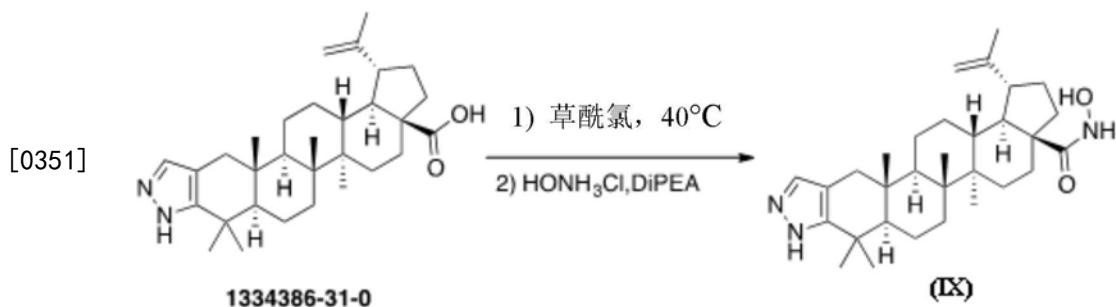
[0346] 按照本文前文所述的一般合成方案 (氧肟酸形成), 从已知的前体CAS编号620958-43-2起始, 得到化合物VIII:



[0348] 白色固体。¹H NMR (300MHz, CD₃OD) : d=10.36 (s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, OH), 8.26 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 3.00 (t, J=9.3Hz, 1H), 2.61 (t, J=12.0Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.74 (s, 3H) (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) d=172.6, 151.3, 151.0, 109.9, 109.4, 54.0, 53.3, 50.6, 49.0, 48.9, 46.7, 42.4, 38.9, 37.3, 35.6, 34.8, 33.4, 32.6, 30.9, 29.0, 25.7, 21.7, 19.5, 18.7, 16.4, 16.2, 14.8。

[0349] 1'-H-羽扇-20(29)-烯并[3,2-c]吡唑-N-羟基-28-酰胺 (化合物IX)

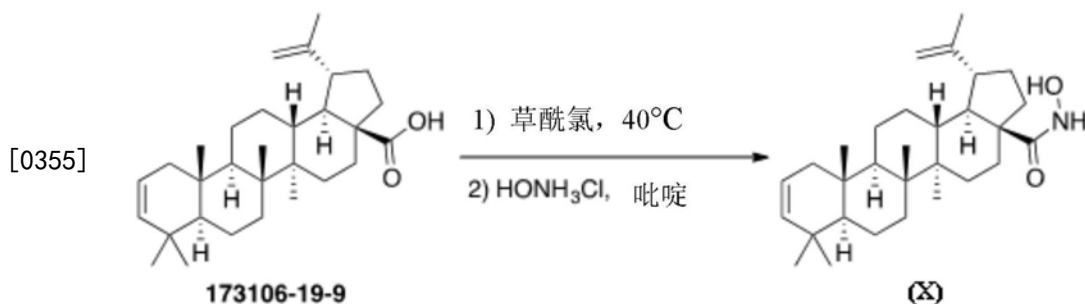
[0350] 按照本文前文所述的一般合成方案 (氧肟酸形成), 从已知的前体CAS编号1334386-31-0起始, 得到化合物IX:



[0352] 浅黄色固体。¹H NMR (300MHz, (CD₃)₂CO) : d=7.17 (s, 1H) , 4.72 (s, 1H) , 4.58 (s, 1H) , 3.20-3.13 (m, 1H) , 2.69-2.61 (m, 1H) , 1.69 (s, 3H) , 1.28 (s, 3H) , 1.18 (s, 3H) , 1.02 (s, 3H) , 0.98 (s, 3H) , 0.80 (s, 3H) (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz, (CD₃)₂CO) d=172.4, 151.0, 149.1, 132.8, 111.9, 109.0, 59.7, 50.0, 53.7, 50.5, 49.2, 46.8, 42.2, 40.7, 38.6, 37.9, 37.7, 36.6, 33.5, 33.4, 32.3, 30.8, 30.6, 25.7, 23.3, 21.4, 19.1, 18.7, 15.6, 14.2, 13.7。

[0353] 羽扇-2, 20 (29) -二烯-N-羟基-28-酰胺(化合物X)

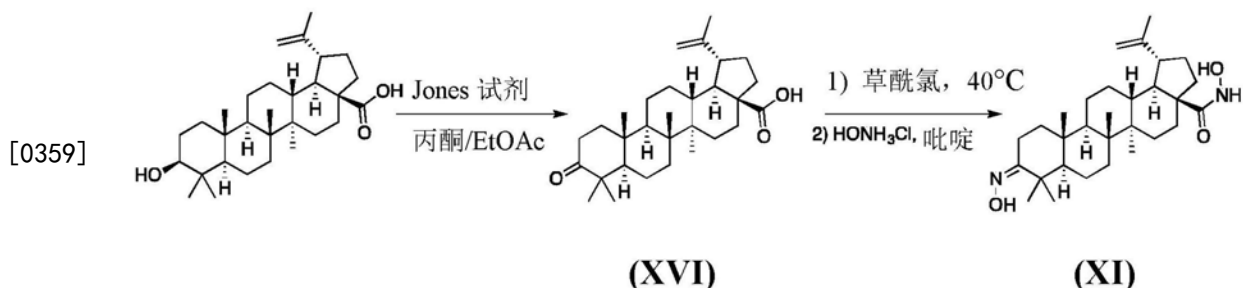
[0354] 按照本文前文所述的一般合成方案(氧肟酸形成), 从已知的前体CAS编号173106-19-9起始, 得到化合物X:



[0356] 浅黄色固体 (54%) ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) : d=5.38-5.28 (m, 2H) , 4.69 (s, 1H) , 4.56 (s, 1H) , 3.01 (t, J=10.7Hz, 1H) , 2.37 (t, J=12.1Hz, 1H) , 1.63 (s, 3H) , 1.21 (s, 3H) , 0.93 (s, 3H) , 0.89 (s, 3H) , 0.82 (s, 3H) , 0.81 (s, 3H) (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) d=175.0, 150.5, 137.9, 121.6, 109.65, 54.3, 52.1, 50.4, 49.2, 42.3, 40.8, 38.4, 37.9, 36.4, 34.6, 33.5, 32.8, 31.7, 30.9, 30.8, 29.7, 29.3, 25.6, 22.6, 19.5, 16.4, 15.8, 14.6, 14.5, 14.3。

[0357] 3-羟基亚胺基-N-羟基-羽扇-20 (29) -烯-28-酰胺-步骤 (b) - (化合物XI)

[0358] 在上文所述的一般合成方案(氧肟酸形成)之前, 按下述进行桦木酸C-3位置羟基向羰基的转化:



[0360] 向桦木酸 (1gr, 2.19mmol) 在丙酮/EtOAc 5:5 (10mL) 中的溶液中, 加入Jones试剂,

直到起始物质(通过TLC控制)消失。将反应物用盐水洗涤,并用EtOAc萃取。有机相用 Na_2SO_4 干燥并在真空中挥发,在硅胶(PE/EtOAc 9:1)上纯化粗制物,得到灰白色固体3-氧代-羽扇-20(29)-烯-28-酸(化合物XVI;CAS编号:4481-62-3)(89%)。

[0361] 然后按照上文所述的一般合成方案,使用化合物XVI进行氧肟酸形成,以得到化合物XI。

[0362] 灰白色固体(65%)。 ^1H NMR(300MHz, CDCl_3): δ =4.73(s, 1H), 4.61(t, $J=6.1\text{Hz}$, 1H), 3.04-3.00(m, 2H), 2.32(s, 1H), 1.68(s, 3H), 1.24(s, 6H), 1.22(s, 3H), 1.12(s, 3H), 0.97(s, 3H), 0.96(s, 3H), 0.91(s, 3H)(仅报告了容易的峰); 177.3, 167.3, 150.5, 109.6, 55.6, 55.0, 50.3, 50.2, 46.8, 42.5, 40.8, 40.2, 38.7, 38.2, 37.9, 37.2, 34.0, 33.3, 30.8, 29.4, 27.4, 25.6, 22.9, 21.5, 21.2, 19.4, 19.1, 16.1, 15.8, 14.6。

[0363] (3 β) 3-羟基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺(化合物XII)

[0364] CAS编号:915415-61-1

[0365] 灰白色固体(55%)。 ^1H NMR(300MHz, CDCl_3): δ =5.34(brt, 1H, H-12), 3.18(dd, $J=9.5, 3.9\text{Hz}$, 1H), 2.09-1.92(m, 3H), 1.06(s, 3H), 0.94(s, 3H), 0.90(d, $J=3.2\text{Hz}$, 3H), 0.87(d, $J=7.8\text{Hz}$, 3H), 0.80(s, 3H), 0.78(s, 3H), 0.75(s, 3H)(仅报告了容易的峰); ^{13}C NMR(75MHz, CDCl_3): δ =176.8, 140.1, 126.6, 126.6, 79.0, 55.1, 52.2, 47.5, 42.4, 39.5, 39.5, 39.0, 38.8, 36.9, 28.1, 25.7, 23.3, 21.2, 17.2, 16.7, 15.7, 15.5。

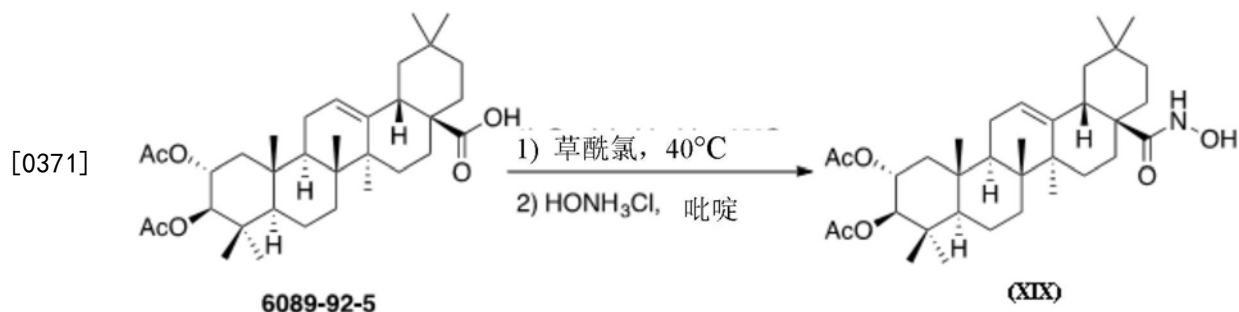
[0366] 3-羟基亚胺基-N-羟基-乌苏-12-烯-28-酰胺(化合物XIII)

[0367] 专利CN102180939中公开的化合物。所述化合物通过进行与化合物XI类似的合成由熊果酸制备,其中在第一步,使用Jones试剂进行从C-3羟基到羰基的转化,然后按照上文所述的一般合成方案进行氧肟酸形成,以得到化合物XIII。

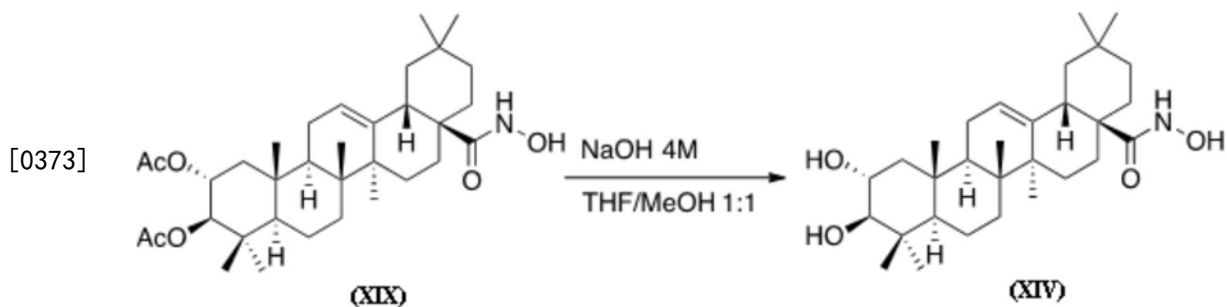
[0368] 浅黄色固体(70%)。 ^1H NMR(300MHz, CDCl_3): δ =5.40(brt, 1H), 3.07(bdt, $J=15.6, 1\text{H}$), 2.12(m, 1H), 1.24(s, 3H), 1.15(s, 3H), 1.08(s, 3H), 1.06(s, 3H), 1.03(s, 3H), 0.94(s, 3H), 0.81(s, 3H)(仅报告了容易的峰); ^{13}C NMR(75MHz, CDCl_3): δ =177.3, 167.7, 140.6, 126.5, 55.7, 52.1, 47.0, 42.5, 40.2, 39.6, 39.4, 39.0, 38.5, 37.0, 36.7, 32.2, 30.6, 29.7, 27.7, 27.4, 24.8, 23.5, 23.4, 23.3, 21.1, 19.0, 17.3, 17.2, 16.8, 15.1。

[0369] (2 α , 3 β) 2,3-二羟基-N-羟基-齐墩果-12-烯-28-酰胺(化合物XIV)

[0370] 按照本文前文所述的一般合成方案(氧肟酸形成),从已知的前体CAS编号:6089-92-5起始,得到化合物XIV:



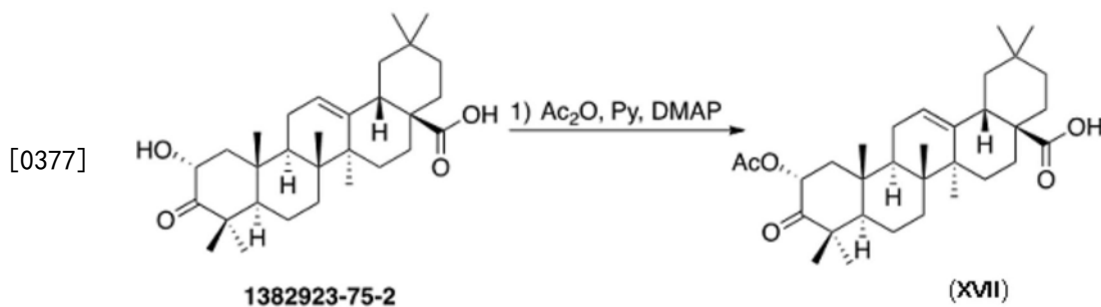
[0372] 将化合物XIX去乙酰化,得到化合物XIV:



[0374] 灰白色固体 (45%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) : d=5.44 (brt, 1H) , 3.72-3.61 (m, 1H) , 2.99 (d, J=9.5Hz, 1H) , 2.45 (d, J=12.2Hz, 1H) , 1.15 (s, 3H) , 1.02 (s, 3H) , 0.98 (s, 3H) , 0.90 (s, 3H) , 0.87 (s, 3H) , 0.82 (s, 3H) , 0.78 (s, 3H) (仅报告了容易的峰) ; ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) : d=175.9, 144.0, 123.6, 83.7, 68.2, 55.0, 47.3, 46.2, 46.1, 45.6, 41.2, 41.0, 39.0, 38.7, 37.8, 33.6, 32.6, 32.4, 32.3, 31.4, 28.5, 27.4, 27.3, 23.2, 23.1, 22.8, 18.6, 16.3, 16.5, 16.1。

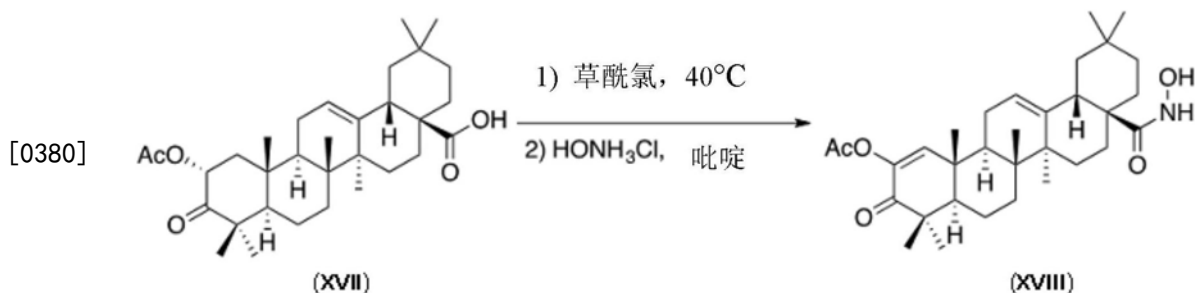
[0375] 2-羟基-3-氧代-齐墩果-1,12-二烯-N-羟基-28-酰胺 (化合物XV)

[0376] 在上文所述的一般合成方案 (氧肟酸形成) 之前,按下述进行已知的山楂酸衍生物 (CAS编号1382923-75-2) C-2位置的羟基的乙酰化:

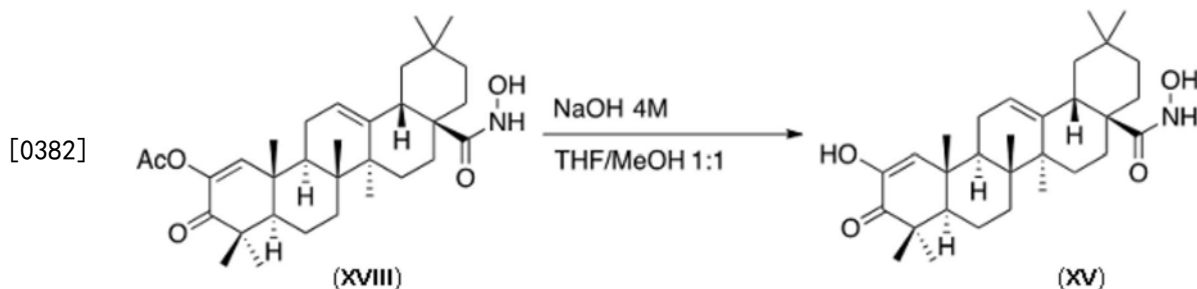


[0378] 向已知的山楂酸衍生物 (1eq/mol) 在无水吡啶 (10mL/gr酸) 中的溶液中,顺序加入乙酸酐 (2eq/mol) 和DMAP (0.1eq/mol)。将反应物在室温下搅拌直到起始物质消失 (通过TLC控制),用甲醇猝灭,用2N H₂SO₄溶液稀释并用EtOAc萃取。将有机相用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并在真空下挥发,以产生化合物XVII,无需进一步纯化。

[0379] 然后,按照上文所述的一般合成方案,使用化合物XVII按下述进行氧肟酸转化:



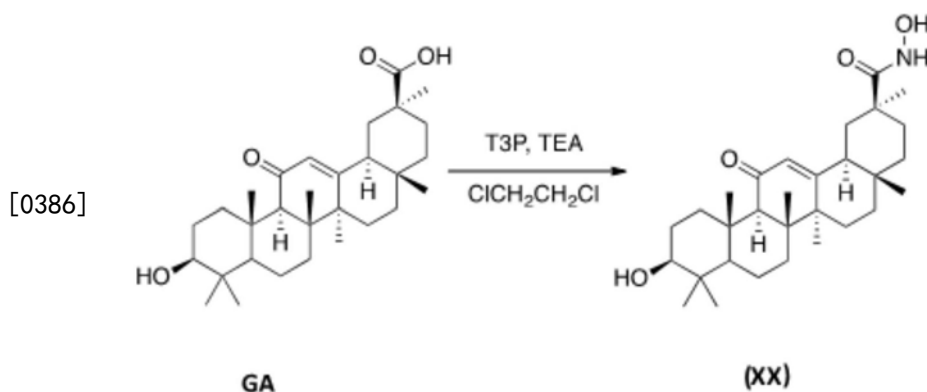
[0381] 然后,将化合物XVII按下述去乙酰化,以得到化合物XV:



[0383] 向化合物XVII (1eq/mol) 在THF/MeOH 1:1中的溶液中,加入NaOH4N (50eq/mol)。将混合物在40℃加热过夜,用2N H₂SO₄溶液猝灭,并用EtOAc萃取。将有机相用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并在真空下挥发。在硅胶上纯化粗制化合物。

[0384] 浅黄色固体 (69%)。¹H NMR (300MHz,CDCl₃): d=6.31 (s, 1H), 5.47 (brt, 1H), 2.46 (d, J=11.3Hz, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.86 (s, 6H), (仅报告了容易的峰); ¹³C NMR (75MHz,CDCl₃) d=201.0, 176.4, 145.2, 143.8, 127.8, 123.2, 53.7, 46.1, 45.5, 44.0, 43.1, 42.4, 40.9, 40.1, 38.4, 33.9, 32.9, 32.0, 30.7, 27.1, 27.0, 25.8, 23.6, 23.4, 21.9, 20.8, 19.6, 18.7, 17.1, 14.2。

[0385] 通过使用T3P/三乙胺方案,在不需要使用保护基情况下从甘草次酸(GA)合成比较化合物XX (Ech-Chahad等人, Tetrahedron Letters 2005, 46:5113-5115)。



[0387] 在计算机芯片上 (in silico) 的测定

[0388] 实施例2. 在计算机芯片上计算PHD2-结合亲和力。

[0389] 从PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得或用 MarvinSketch (ChemAxon, Cambridge, MA) 设计分子结构。所用的受体模型是PDB参照4BQW。通过使用 AutoDock4 (Morris等人, J.Comp.Chem.2009Dec;30 (16) 2785-91) 和 Vina软件 (Trott和 Olson, J.Comp.Chem.2010Jan 30;31 (2):455-61) 以虚拟筛选工具 PyRx (Wolf LK.Chem.& Eng.News 2009, 87) 计算结合特性。按照之前关于不同PHD2配体的一些结合位点的发现 (Rabinowitz MH, J.Med.Chem.2013Dec 12;56 (23):9369-4025), 设置在受体分子表面周围对接的搜索空间。

[0390] 一旦已经进行分析, AutoDock Vina提供估算的结合亲和力值, 其是分子间能 (其是由于两个分子之间的相互作用) 和扭转自由能罚分 (其是由于这些分子采取的正确适配相互作用表面的构象而产生) 的和。负值表示键是热力学稳定的, 而正值意指不稳定性。

[0391] 表I显示关于本发明所述的化合物以及阳性对照 (IOX-2) 和阴性对照 (甘草次酸) 的PHD2-结合能 (Kcal/mol)。显示了使用结构4BQW (来自蛋白数据库 (Protein Data Bank))

来自AutoDock-Vina的平均值。显示了来自三次独立的实验的平均值。

化合物	B.E. AutoDock (Kcal/mol)
石竹素	-6.35
化合物 II	-6.33
化合物 III	-3.30
化合物 IV	-6.41
化合物 V	-3.35
化合物 VI	-5.27
桦木酸	-4.76
化合物 VII	-6.55
化合物 VIII	-5.77
化合物 IX	-4.33
化合物 X	-7.08
化合物 XI	-6.09
熊果酸	-5.74
化合物 XII	-6.01
化合物 XIII	-5.45
山楂酸	-3.20
化合物 XIV	-4.30
化合物 XV	-3.57
IOX 2	-9.05
甘草次酸	-1,24

[0393] 表I. 三萜系化合物和衍生物针对PDH2的结合能。PHD2-结合能 (Kcal/mol)。显示了使用结构4BQW(来自蛋白数据库(Protein Data Bank))的来自AutoDock/Vina的平均值。显示了来自三次独立的实验的平均值。

[0394] 搜索空间限制在残基H313、D315、H374、R383、Y303、Y310、Y329、I327、I256和M299周围的300 Å体积,通过沿着三个轴以10埃(Amstrong)为单位构建超过这些空间的格栅,提议所述残基为主要的结合位点(Rabinowitz MH,J.Med.Chem.2013Dec 12;56(23):9369-

4025) (图1)。发现关于化合物VII的获得的结合能为-6.55Kcal/mol, K_i 15.74 μ M (在298.15°K), 分子间能为-7.38Kcal/mol, 以及与原子位置的均方根偏差为0.0 Å, 由此改善关于其天然前体桦木酸发现的结合特征, 结合能为-4.76Kcal/mol。

[0395] 体外和体内测定

[0396] 实施例3.HIF-1 α 活性的选择性诱导

[0397] 为了研究不同化合物的生物学活性, 在NIH-3T3-EPO-Luc细胞(表II)或HaCaT-EPO-luc细胞(图2)中进行HIF-1 α 反式激活测定。NIH3T3-EPO-luc和HaCaT-EPO-luc细胞已经稳定转染了质粒Epo-Luc质粒。EPO-低氧响应元件(Hypoxia Response Element, HRE)-荧光素酶受体质粒包含三个拷贝的融合在荧光素酶基因上的来自红细胞生成素基因启动子的HRE共有序列。将NIH3T3-EPO-luc细胞保持在37°C在包含5%CO₂的湿润气氛中的补充了10%胎牛血清(FBS)和1%(v/v)青霉素/链霉素的DMEM中。DFX购自Sigma-Aldrich(USA)。在测定前那天, 接种细胞(在96孔平板中, 1x10⁴个/孔)。次日, 将细胞用增加浓度的齐墩果酸(OA)、桦木酸(BA)、熊果酸(UA)、山楂酸(MA)、甘草次酸(GA)、式(I)、II至XV的化合物或比较化合物XX和CDDO-Me刺激。刺激六小时后, 将细胞在室温(RT)在水平摇床上在25mM Tris-磷酸盐pH 7.8, 8mM MgCl₂, 1mM DTT, 1% Triton X-100, 和7%甘油中裂解15分钟。使用微量平板发光计(Berthold)按照荧光素酶测定试剂盒(Promega, Madison, WI, USA)的使用说明测量荧光素酶活性。计算RLU, 并且使用下述等式, 相对于150 μ M去铁胺(DFX)确定EC₅₀和IRA(固有的相对活性)值: IRA系数 = $(EC_{50-DFX} \times E_{max}) / (EC_{50} \times E_{max-DFX})$, 其中EC₅₀和E_{max}表示激动剂的EC₅₀和E_{max}, 并且EC_{50-DFX}和E_{max-DFX}表示标准激动剂DFX的EC₅₀和E_{max}值(表II)。

[0398] 用作本发明包括的化合物的合成模板的天然三萜系化合物(OA; 齐墩果酸, BA; 桦木酸; UA, 熊果酸, 和MA; 山楂酸)都不能激活作为HIF-1 α 激活的替代标记的EPO启动子。相反, 所有本发明的三萜系化合物衍生物清楚地激活HIF-1 α 途径(表II)。并且, 如下表II所示, 作为式I的齐墩果酸衍生物的化合物II至VI提供HIF途径的激活, 而与此相反, 在位置2(对应式I的位置B)包含氰化物基团的齐墩果衍生物, 如CDDO-Me, 不导致HIF途径的激活。

[0399] 由此, 可以得出结论: 在所述化合物中引入的化学修饰对于抑制PHD2的酶活性是至关重要的, 并且因此对于激活HIF途径也是至关重要的, 但对于化合物与蛋白的结合不是至关重要的。

[0400] 表II还显示了GA及其氧肟酸衍生物化合物XX不激活HIF-1 α 途径。因此, 特别地, 可以得出结论: 在本发明定义的骨架位置28引入的化学修饰对于抑制PHD2的酶活性是至关重要的, 并且因此对于激活HIF途径是至关重要的, 但对于化合物与蛋白的结合不是至关重要的。

化合物	功效 HIF-1 α (IRA 系数)	效力 EC ₅₀ HIF-1 α (μ M)
OA		- (>50)
II	0,39	16.37
III	0,43	3.83
IV	0,15	11.39
V	0,16	6.71
VI	0,16	5.00
BA		- (>50)
VII	0,36	4.81
VIII	0,55	2.58
[0401] IX	0,34	2.41
X	0,48	3.24
XI	0,31	2.58
UA		- (>50)
XII	0,17	7.69
XIII	0,10	8.93
MA		- (>50)
XIV	0,10	7.10
XV	0,06	11.22
GA		- (>50)
XX		- (>50)
CDDO-Me		- (>50)

[0402] 表II. NIH-3T3-EPO Luc成纤维细胞中的HIF-1 α 反式激活测定。NIH3T3-EPO-luc细胞稳定转染了Epo-Luc质粒,所述质粒包含三个拷贝的融合在荧光素酶基因上的来自红细胞生成素基因启动子的低氧响应元件共有序列。显示了关于HIF-1 α 激活的功效和效力。

[0403] 接着,研究该化合物在另一种细胞类型如角质形成细胞系HaCaT-EPO-Luc中的活性。将细胞维持在37 $^{\circ}$ C包含5%CO₂的湿润气氛中的补充了10%胎牛血清(FBS)和1%(v/v)青霉素/链霉素的DMEM中。在测定前一天接种细胞(在24孔平板中,1x10⁵个/孔),然后用DFX(150 μ M)或增加浓度的化合物II至XV刺激6小时。然后,将细胞在25mMTris-磷酸盐pH 7.8, 8mM MgCl₂, 1mM DTT, 1% Triton X-100和7%甘油中裂解。使用TriStar LB 941多方式微量平板读数仪(Berthold)按照荧光素酶测定试剂盒(Promega, Madison, WI, USA)的使用说明测定荧光素酶活性。上述测定由图2示例,其显示DFX和化合物II至XV在HaCaT-EPO-Luc细胞中的低氧模拟作用。将DFX(150 μ M)视为相对于未处理的细胞的100%诱导,提供作为激活的百分数的数据。与未处理的细胞相比,对所有三萜系化合物衍生物观察到荧光素酶活性的明显增加。

[0404] 为了进一步研究本发明所述的化合物的靶向选择性,分析了天然三萜系化合物(OA; BA, UA和MA)和本发明公开的式(I)的化合物II至XV、比较化合物CDDO-Me对NF- κ B抑制、STAT-3抑制、Nrf2激活和TGR5激活的影响。对于该研究,分别使用细胞系NIH-3T3-KBF-Luc、HeLa-STAT3-Luc、HaCaT-ARE-Luc和CHO-TGR5-CRE-luc。NIH3T3-KBF-Luc细胞系稳定转染质粒KBF-Luc质粒,所述质粒包含三个拷贝的融合在驱动荧光素酶基因的最小猿猴病毒40启动子上的NF- κ B结合位点(来自主要组织相容性复合物启动子)。将细胞(1x10⁴个/孔)接种

在96孔平板中,用增加浓度的化合物II至XV处理15分钟,然后用30ng/ml TNF α 刺激。6小时后,如上文所示测量细胞裂解物中的荧光素酶活性。计算RLU,并且将结果表示为由TNF α 诱导的NF- κ B活性(100%激活)的抑制百分数(表III)。

化合物	IC ₅₀ NF- κ B (μ M)	IC ₅₀ STAT3 (μ M)	EC ₅₀ NRF2 (μ M)	IC ₅₀ NRF2 (μ M)	EC ₅₀ TGR5 (μ M)
OA	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	18.90
II	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)
III	-(>50)	-(>50)	23.93	-(>50)	-(>50)
IV	-(>50)	-(>50)	10.04	-(>50)	-(>50)
V	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)
VI	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)
BA	-(>50)	-(>50)	9.02	-(>50)	22.15
VII	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)
VIII	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	9.62
XI	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	17.50
X	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)
XI	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	17.50
UA	-(>50)	-(>50)	38.36	-(>50)	11.46
XII	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	5.91
XIII	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)
MA	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	10.19
XIV	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)	-(>50)
XV	(>50)	(>50)	(>50)	(>50)	(>50)
CDDO-Me	1.20	2,38	40,94	0.06	(>50)

[0406] 表III.对NF- κ B、STAT-3、Nrf2和TGR5途径的影响。

[0407] 化合物II至XV,OA;BA,UA,MA和比较化合物CDDO-Me对NF- κ B抑制(IC₅₀)、STAT-3抑制(IC₅₀)、Nrf2激活(EC₅₀)与抑制(IC₅₀)以及TGR5激活(EC₅₀)的影响。我们分别使用下述细胞系:NIH-3T3-KBF-Luc,HeLa-STAT3-Luc,HaCaT-ARE-Luc和CHO-TGR5-CRE-luc。显示了IC₅₀和EC₅₀数据。

[0408] HeLa-STAT3-luc细胞稳定转染了质粒4xM67pTATA TK-Luc。将细胞(20x10³个细胞/ml)接种在96孔平板中,采用增加浓度的化合物II至XIV和比较化合物CDDO-Me处理15分钟,然后用IFN- γ 25IU/ml刺激。6小时后,如上文所示测量细胞裂解物中的荧光素酶活性。计算RLU,并且结果表示为由IFN- γ 诱导的STAT3活性(100%激活)的抑制百分数(表III)。HaCaT-ARE-Luc细胞系包含Nqo1抗氧化剂响应元件(ARE)-Luc报道子质粒。ARE被CNC家族因子的所有成员(Nrf1,Nrf2,Nrf3和p45NF-E2)激活。将细胞以25x10³个细胞/孔的浓度在96孔平板中在CO₂培养箱中在37°C培育。为了诱导Nrf2激活,将细胞用增加浓度的化合物II至XV和比较化合物CDDO-Me处理6小时。作为阳性对照,将细胞用0.02mM抗氧化剂叔丁基氢醌(TBHQ)处理。如上文所示测定细胞裂解物中的荧光素酶活性,并且计算EC₅₀(表III)。CHO-TGR5-CRE-Luc细胞稳定转染pTGR5和CRE-Luc。CRE-反应性荧光素酶构建体在最小(m)CMV启动子和CRE转录响应元件(TRE)串联重复的控制下编码萤火虫荧光素酶报道子基因,并且用于监测由TGR5激动剂激活的cAMP信号传导途径。将细胞(1x10⁴个/孔)接种在96孔平板中,用增加浓度的化合物II至XV和CDDO-Me处理6小时。作为阳性对照,将细胞用10 μ M LCA(石胆酸)处理。如上文所示测量细胞裂解物中的荧光素酶活性,并且计算EC₅₀(表III)。

[0409] 所述化合物都不抑制分别由TNF α 和IFN γ 诱导的NF- κ B和STAT3途径。另外,所述化

合物都不激活Nrf2途径,仅化合物VIII、XI和XII表现出TGR5激动活性(表III)。相反,CDDO-Me清楚地抑制NF- κ B和STAT-3信号传导途径并且激活Nrf2途径。该结果还证明,氰化物基团对于某些生物学活性是至关重要的,但不是激活HIF-1 α 途径所需要的(表III)。

[0410] 实施例4.三萜系化合物衍生物稳定HIF-1 α 和HIF-2 α

[0411] 为了获得本发明所述的化合物对调节HIF-1 α 稳定化的深刻了解,研究了对不同细胞类型中HIF-1 α 表达的影响。将人少突胶质细胞M013.3细胞用150 μ DFX或10 μ M齐墩果酸(OA),化合物II,III,IV,V,VI(图3A),桦木酸(BA),化合物VII,VIII,IX,X,XI(图3B),熊果酸(UA),山楂酸(MA),化合物XII,XIII,XIV和XV(图3C)刺激3小时。之后,将细胞用PBS洗涤并用50 μ l补充了10mM NaF、1mM Na₃VO₄、10 μ g/ml亮肽素(leupeptine)、1 μ g/ml胃蛋白酶抑制剂和抑肽酶与1 μ l/ml饱和的PMSF的NP-40缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5,150mM NaCl,10%甘油和1%NP-40)温育。离心后,将上清与SDS样品缓冲液混合,并在95 $^{\circ}$ C煮沸。将蛋白在8-10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳并转移到聚偏氟乙烯膜上(每张膜,20V和30min)。用在TBST缓冲液中的脱脂乳或BSA封闭后,加入一级抗体。将洗涤的膜用适当的与辣根过氧化物酶偶联的二级抗体温育,所述二级抗体由增强的化学发光系统(USB)检测。针对HIF-1 α 的抗体(610959)来自BD Biosciences,并且抗体抗- β -肌动蛋白(AC-74)购自Sigma-Aldrich(Saint Louis,MO,USA)。

[0412] 在正常含氧量条件下(21%O₂),本发明所述的所有化合物都升高HIF-1 α 蛋白水平。诱导的程度与去铁胺(desferrioxamine)(DFX)的诱导程度相当,去铁胺为一种已知稳定HIF-1 α 的铁螯合剂(图3A,3B和3C)。

[0413] 接着,将人胚肾293细胞(293T)用增加浓度的化合物VII或用DFX(150 μ M)刺激3小时。之后,如图3所示,进行蛋白分离和蛋白质印迹。针对HIF-1 α 的抗体(610959)来自BD Biosciences(USA),抗体抗-PHD1(ab80361)和抗-PHD2(ab109088)来自Abcam(Cambridge,UK),抗体抗- β -肌动蛋白(AC-74)购自Sigma-Aldrich(Saint Louis,MO,USA)。

[0414] 结果清楚地显示,作为本发明所述的化合物的代表的化合物VII稳定HIF-1 α 表达,而不影响PDH1和PDH2的表达(图4)。

[0415] 由于PDH2和PDH3还调节HIF-2 α 的表达,因此研究了化合物VII对获自Innoprot SL(Spain)(参照p10472)的人胰岛来源的前体细胞(hIPC)中的HIF-2 α 稳定化的影响。将hIPC用增加浓度的化合物VII或用DFX(150 μ M)刺激3小时。之后,如图3所示,进行蛋白分离和蛋白质印迹。针对HIF-2 α (ab8365)和PHD3(ab30782)的抗体来自Abcam(Cambridge,UK),抗体抗- β -肌动蛋白(AC-74)购自Sigma-Aldrich(Saint Louis,MO,USA)。(图5)。

[0416] 结果清楚地显示,作为本发明所述的化合物的代表的化合物VII稳定HIF-2 α 表达,而不影响PHD3的表达(图5)。

[0417] 总之,结果表明化合物VII结合PDH2,抑制其活性,并且因此稳定HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白水平。

[0418] 实施例5.化合物VII诱导血管生成。

[0419] 为了检测化合物VII刺激在生理学模型中的功能结果,测量作为血管生成模型的内皮细胞管形成。提供CellPlayerTM GFP AngioKit-96(Essen BioScience Inc.,Welwyn Garden City,UK)作为在管形成最早阶段的人基质(正常人皮肤成纤维细胞,NHDF)和内皮细胞(HUVEC)的生长共培养物。按照供应商方案进行CellPlayer 96孔动力学血管生成测

定。简言之,将慢病毒感染的绿色荧光蛋白(GFP)-HUVEC与正常的人皮肤成纤维细胞在96孔微量平板中共同培养。将平板放置在IncuCyte中,并且,每6小时自动获得相和荧光照片,持续7天。在第1天,将化合物VII(1和2,5 μ M)或VEGF(10ng/ml)添加到内皮管网络上,并且在整个实验过程中保持。使用Essen BioScience血管生成分析组件(Essen BioScience Angiogenesis Analysis Module)将7天测定期间的管形成定量。该组件提供多个测定度量,包括管长度和分支点形成,其用来评估对网络形成的血管生成作用。简言之,分析荧光照片以产生紧密类似于体外网络的分段罩物。然后提炼该罩物以特别鉴定管形成事件,并且使用IncuCyte和GraphPad Prism软件(La Jolla,CA)将动力学反应绘图。

[0420] 在图6中,显示了化合物VII 1 μ M以及阳性对照(rFGF;10ng/ml和VEGFA;10ng/ml)显著增加HUVEC细胞中的网络长度。

[0421] 实施例6. 化合物VII提高红细胞生成素(EPO)的血浆水平。

[0422] 红细胞生成素(EPO)是最早记载的且最有效的HIF靶基因之一;在转录水平上被正调节。此处,检验了化合物VII在体内调节EPO水平的能力。将十六周龄的C57BL/6雄性小鼠用桦木酸(60mg/kg)或化合物VII(30mg/kg或60mg/kg)腹膜内(i.p.)处理。在处理4小时后,在全身麻醉下采集血液样品,并且使用小鼠EPO ELISA试剂盒(R&D Systems)按照供应商的使用说明定量血浆中的EPO循环水平。EPO值表示平均值 \pm SEM(n=3)。

[0423] 如图7所示,在小鼠中体内施用作为本发明所述的化合物的代表的化合物VII(30和60mg/kg/天)强烈增加了循环的EPO血浆水平。相反,化合物VII的母体桦木酸(BA)不影响血浆中的EPO水平。

[0424] 实施例7. 化合物VII对纹状体细胞中3-NP-诱导的细胞毒性的影响和小鼠中3-NP-诱导的亨廷顿病的预防作用。

[0425] 7.1: 化合物VII对纹状体细胞中3-NP-诱导的细胞毒性的影响

[0426] 为了研究纹状体Q7和Q111细胞中的HIF激活是否足以保护纹状体神经元(提供神经保护作用),检验了化合物VII对3-NP诱导的死亡的影响。具体而言,研究用化合物VII预处理6小时对暴露于3-硝基丙酸(3-NP)24小时的STHdh^{Q7/Q7}(纹状体Q7)和STHdh^{Q111/Q111}(纹状体Q111)细胞的影响。

[0427] STHdh^{Q111/Q111}细胞表达突变形式的亨廷顿蛋白,并且STHdh^{Q7/Q7}细胞表达这种蛋白的野生型形式。将由Hdh^{Q111/Q111}(突变体)和Hdh^{Q7/Q7}(野生型)敲入小鼠同窝幼崽的E14纹状体原基建立的克隆纹状体细胞系用转导tsA58/U19大T-抗原的复制缺陷型反转录病毒永生生化(Trettel F.等人,Hum Mol Genet.2000;9:2799-2809)。将纹状体Q7和Q111细胞保持在含有25mM D-葡萄糖、1mM L-谷氨酰胺、10%胎牛血清(FBS)、1mM丙酮酸钠和400 μ g/mL遗传霉素的Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)中,并且在33 $^{\circ}$ C用5%CO₂温育。

[0428] 3-硝基丙酸(3-NP)是线粒体复合物II酶的有效不可逆抑制剂,并且导致线粒体功能障碍和氧化性应激。

[0429] 将STHdh^{Q7/Q7}和STHdh^{Q111/Q111}细胞(在96孔平板中,10⁴个细胞/孔)用YOYO-1(Life Technologies)温育,然后用3-NP(10mM)和或DFX(50 μ M)(作为PHD抑制的阳性对照)处理。将YOYO-1稀释在细胞培养基中,并且添加到实验孔和对照孔中至终浓度为0.1 μ M。YOYO-1是细胞不渗透氧化物二聚体核酸染料,其仅可进入具有损坏的质膜的细胞并且将核DNA荧光染色。损坏的细胞对YOYO-1的摄入与YOYO-1荧光的增加相关联。将处理的细胞放置在

Incucyte FLR成像系统中,并且在3-NP处理24小时后测量YOYO-1荧光。在温育期间之后,使用Incucyte FLR软件进行对象计数分析,以计算YOYO-1荧光阳性细胞的总数和全部包含DNA的对象(终点)。对每个处理组,通过将YOYO-1荧光阳性对象的数目除包含DNA的对象总数来计算细胞毒性指数,并且转化为细胞死亡的百分数。

[0430] STHdh^{Q111/Q111}细胞比STHdh^{Q7/Q7}细胞对暴露于3-NP更敏感,并且化合物VII清楚地提供针对3-NP-诱导的细胞毒性的显著水平的神经保护作用(图8)。尽管程度较小,但是DFX也保护细胞免受3-NP的细胞毒性活性。

[0431] 7.2: 在鼠中预防3-NP诱导的亨廷顿病

[0432] 用3-硝基丙酸(3-NP)使小鼠中毒导致无数的神经学、生物化学和组织学作用,其暗示亨廷顿病(HD)病理学的一些方面。与对照动物(没有3-NP中毒的)相比,3NP-处理的小鼠在后肢抱握、张力失调、脊柱后凸和一般的运动活动方面表现出高评分。

[0433] 通过六次腹膜内(i.p.)注射3-硝基丙酸(3NP)(30mg/kg;每12小时注射一次,在PBS中制备)在16周龄的C57BL/6雄性小鼠(Harlan Ibérica,巴塞罗那,西班牙)中诱导纹状体神经变性。将3NP-处理的动物和没有损伤的对照组(注射PBS)用于使用桦木酸(30mg/Kg)和化合物VII(30mg/Kg)的药理学研究。处理由5次腹膜内(i.p.)注射组成,每24小时注射50mg/kg测试化合物或媒介物(盐水缓冲液中10%DMSO加6,2%Tween 20),第一次注射在第一次3NP注射前24小时,其余的剂量给药在3NP注射前30分钟。对小鼠进行行为测试,以确定它们的神经学状态。评价一般的运动活动、后肢抱握和张力失调以及躯干张力失调。所有的行为测试在药物注射之前进行,以避免研究的化合物的急性效应。所有的行为测试在药物注射之前进行,以避免研究的化合物的急性效应,并且所有的动物在最后一次3NP注射后12小时安乐死。一旦安乐死,将动物解剖,并且快速摘下它们的脑。右半球用来解剖纹状体,将其在RNAlater(Sigma-Aldrich,德国)中快速冷冻,以通过实时PCR分析炎性标记。将左半球在新鲜的4%低聚甲醛(在0.1M磷酸盐缓冲的盐水中)中在4℃固定48小时,并且包埋在石蜡中用于组织学分析。

[0434] 图9显示化合物VII清楚地减轻由3-NP中毒诱导的临床症状。桦木酸(BA)也表现出一些神经保护活性,但是程度较低。

[0435] 接着,还使用3NP-损伤的小鼠的纹状体实质进行一些与炎症和神经变性相关的组织学和分子标记分析,所述标记在该实验模型中受到影响。这些3NP-处理的动物的纹状体实质表现出Nissl-染色细胞的重要减少,这表明由3NP引起的神经元死亡的重要程度,通过用化合物VII处理明显地防止了该神经元死亡,但是使用桦木酸(BA)没能防止(图10)。

[0436] 另外,化合物VII-介导的神经保护作用与减少的3NP-诱导的小胶质细胞增生和星形胶质细胞增生相关,其由Iba1和GFAP免疫组织化学确定(图11)。对于该测试,将用3-硝基丙酸(3-NP)中毒的小鼠用于确定小胶质细胞激活和星形胶质细胞增生,包括使用未中毒小鼠的对照(3NP,3NP+BA和3NP+化合物VII)。通过对不同组小鼠的脑切片的免疫染色来确定Iba-1和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)表达。使用Image J软件进行不同标记的定量。图11显示了小胶质细胞(Iba1⁺)和星形胶质细胞(GFAP⁺)的总平均数。

[0437] 最后,在3NP-损伤的小鼠中,炎性酶COX-2和iNOS的表达显著上调,伴有促炎性细胞因子IL-1 β 和IL-6的表达增加。与3NP+媒介物小鼠相比,在3NP+化合物VII(30mg/kg)处理的小鼠中,关于COX-2(图12D)、IL-1 β (图12B)、IL-6(图12A)和iNOS(图12C)的mRNA表达被下

调。桦木酸(BA)处理(30mg/kg)也抑制炎性标记的表达(如图12所示)。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算表达水平。值表示为每组6只动物的平均值 \pm SEM。

[0438] 实施例8.用于本发明的实时定量PCR(实施例7)。

[0439] 使用RNeasy脂质组织迷你试剂盒(RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, GmbH)从纹状体(3NP模型)分离总RNA。通过在260nm处的光谱测定法来定量提取的RNA的总量和通过其在260与280nm的吸光度值之间的比例来定量纯度。去除基因组DNA以消除DNA污染。使用iScriptTM cDNA合成试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)从多至1 μ g的总RNA(来自每组至少3只动物的汇集)合成单链互补DNA。将反应混合物在-20 $^{\circ}$ C保持冷冻,直到用于酶促扩增时。使用iQTM SYBR Green Supermix(Bio-Rad)来定量COX-2、IL-6、IL-1 β 和iNOS的mRNA水平。使用CFX96实时PCR检测系统(Bio-Rad)进行实时PCR。使用GAPDH看家基因来使每份样品中的mRNA表达水平标准化。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算表达水平。表IV提供了寡核苷酸引物的序列。

[0440] 表IV.用于定量聚合酶链式反应的小鼠引物序列的列表。

[0441]

基因	正向	反向
IL-6	5'-GAACAACGATGATGCACTTGC-3'	5'-TCCAGGTAGCTATGGTACTCC-3'
iNOS	5'-AACGGAGAACGTTGGATTG-3'	5'-CAGCACAAGGGGTTTTCTTC-3'
COX-2	5'-TGAGCAACTATCCAAACCAGC-3'	5'-GCACGTAGTCTTCGATCACTATC-3'
IL-1 β	5'-CTCCACCTCAATGGACAGAA-3'	5'-GCCGTCTTTCATTACACAGG-3'
GAPDH	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3'	5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'

[0442] 所述结果证实了本发明所述的化合物用于临床管理其治疗响应于HIF激活的病症和疾病的应用,所述病症和疾病如卒中,脑瘫,创伤性损伤,神经变性疾病(如多发性硬化、亨廷顿病、阿尔茨海默病和帕金森病),IBD,心肌缺血-再灌损伤,急性肺损伤,器官移植,急性肾损伤和动脉病。

[0443] 实施例9.化合物VII对糖尿病和代谢病理学的高脂肪饮食(HFD)模型的作用。

[0444] 用高脂肪饮食喂养的小鼠是用于受损的葡萄糖耐量(IGT)和2型糖尿病的常用模型。实验中使用八周龄的雄性C57BL/6小鼠(Charles River-France)。将小鼠保持在控制条件下[12h光/暗周期;温度20 $^{\circ}$ C(\pm 2 $^{\circ}$ C)和40-50%相对湿度],自由获得自来水和随意获得标准啮齿动物食物。适应1周后,将小鼠分成两组,并随意用标准饮食-CD-(Code U8220G10R,SAFE Diets,Augy,法国)或高脂肪饮食-HFD-(D12451;Research Diets,New Brunswick,NJ)喂养,以诱导肥胖15周(饮食-诱导的肥胖,DIO)。为了评估化合物VII在该DIO模型中潜在有益的代谢作用,通过从饮食暴露的第12周至第15周每24小时进行腹膜内(i.p.)注射而进行所述化合物(30mg/kg体重)的药理学施用。对照动物接受相应的媒介物注射(1:1:18乙醇:克列莫佛(Cremophor):盐水)。

[0445] 为了确保HFD喂养方案的有效性并评估化合物在减轻代谢表型方面的功效,使用EchoMRITM700分析仪(Houston,TX,软件v.2.0)通过QMR(定量磁共振)进行脂肪和瘦肉量的身体组成分析。在这种情形中,在实验期间的三个时间点进行MRI扫描:在开始饮食暴露之前,在喂养方案12周后(同时开始治疗)和在实验程序结束时(在饮食暴露的第15周)。另外,在处死前五天,对过夜禁食的小鼠进行葡萄糖耐量测试(GTT)。为此目的,以2mg葡萄糖/g体重对小鼠腹膜内注射,并且在注射前和注射后30、60和120min,使用Accu-Chek

Advantage® (Roche) 血糖仪测量血糖。在实验结束时,将小鼠处死,并且使用EDTA-包被的管采集血液样品,并将血浆保存在-80°C。使用酶比色试剂盒(QCA,巴塞罗那,西班牙)测量血浆甘油三酯。

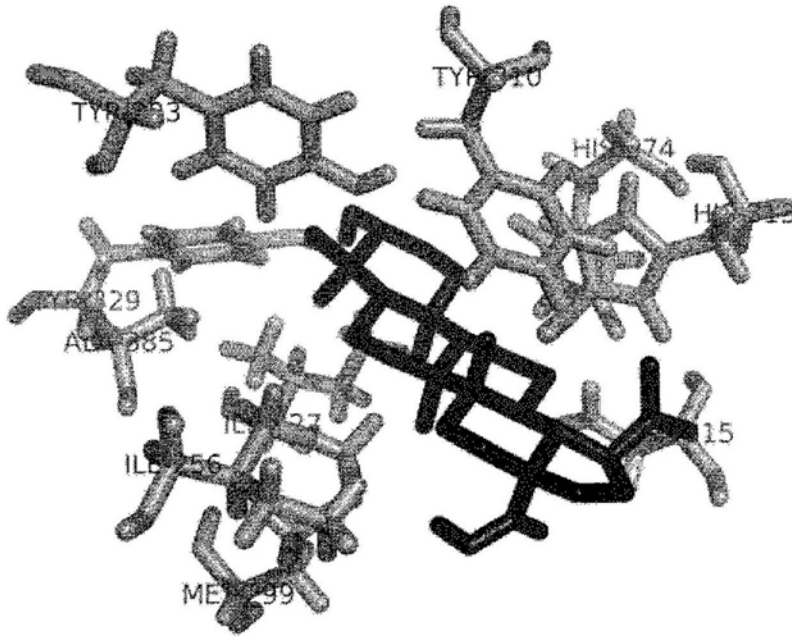
[0446] 我们发现化合物VII减少:体重增加(图13A)、脂肪量增加(图13B)和肥胖(图13C)。并且,化合物VII改善HFD小鼠的糖耐量(图14)并使血浆甘油三酯水平正常化(图15)。我们的结果与之前的报道一致,之前的报道表明PDH抑制剂改善由HFD诱导的小鼠肥胖和糖尿病模型中的葡萄糖和脂质代谢(Rahtu-Korpela等人,Diabetes.2014Oct;63(10):3324-33)。因此,所述结果表明:本发明的化合物可用于治疗糖尿病或其他相关的代谢病理学,如高甘油三酯血症。

序列表

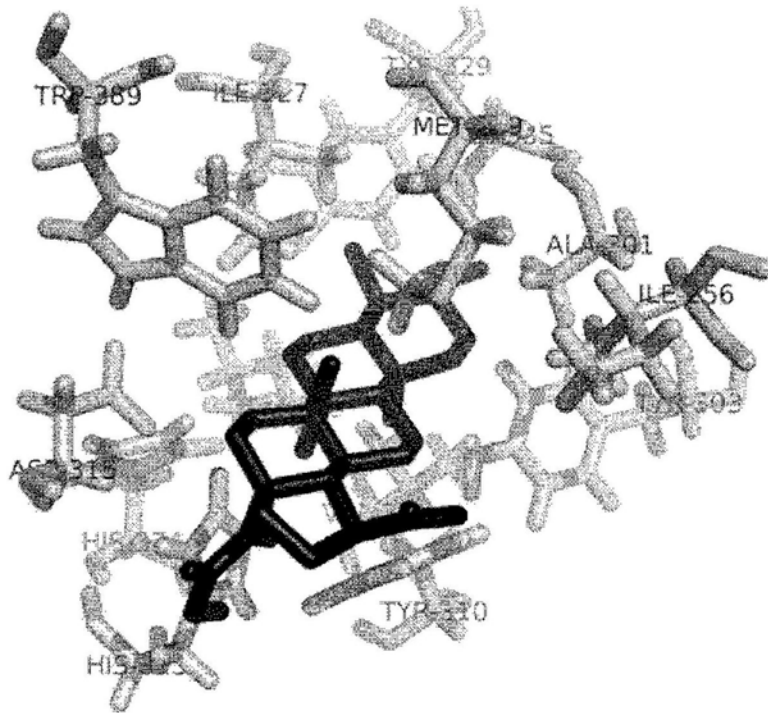
	<110> 维瓦赛尔生物技术西班牙有限公司	
	<120> 三萜系化合物衍生物	
	<130> PCT-07664	
	<150> EP16193684.4	
	<151> 2016-10-13	
	<160> 10	
	<170> BiSSAP 1.3.6	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IL-6正向引物	
	<400> 1	
	gaacaacgat gatgcacttg c	21
[0001]	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IL-6反向引物	
	<400> 2	
	tccaggtagc tatggtactc c	21
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> iNOS正向引物	
	<400> 3	
	aacggagaac gttggatttg	20
	<210> 4	
	<211> 20	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> iNOS反向引物	
	<400> 4	
	cagcacaagg ggttttcttc	20
	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> COX-2正向引物	
	<400> 5	
	tgagcaacta ttccaaacca gc	22
	<210> 6	
	<211> 23	
[0002]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> COX-2反向引物	
	<400> 6	
	gcacgtagtc ttcgatcact atc	23
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IL-1Beta正向引物	
	<400> 7	
	ctccacctca atggacagaa	20
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> IL-1Beta反向引物		
	<400> 8		
	gccgtctttc attacacagg		20
	<210> 9		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> GAPDH正向引物		
[0003]	<400> 9		
	tggcaaagtg gagattggtg cc		22
	<210> 10		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> GAPDH反向引物		
	<400> 10		
	aagatggtga tgggcttccc g		21



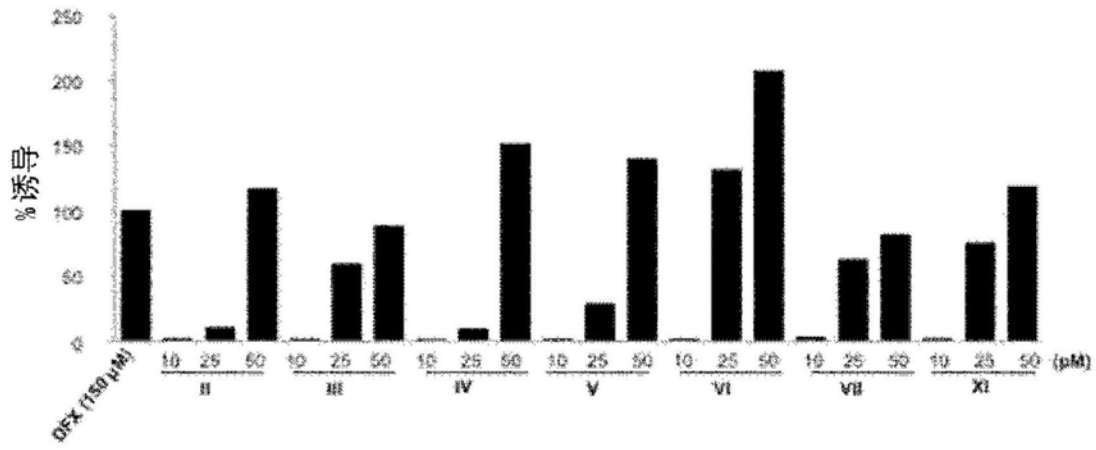
1A



1B

图1

2A



2B

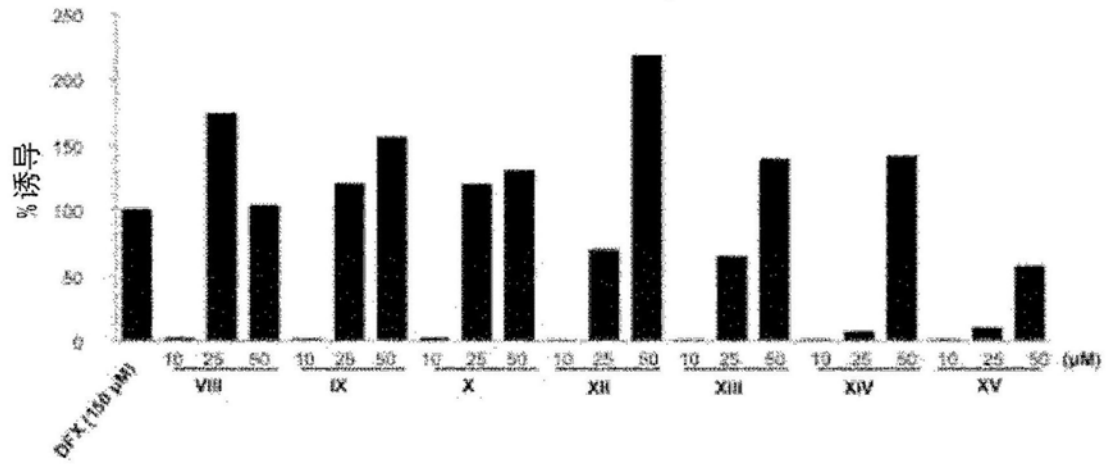


图2

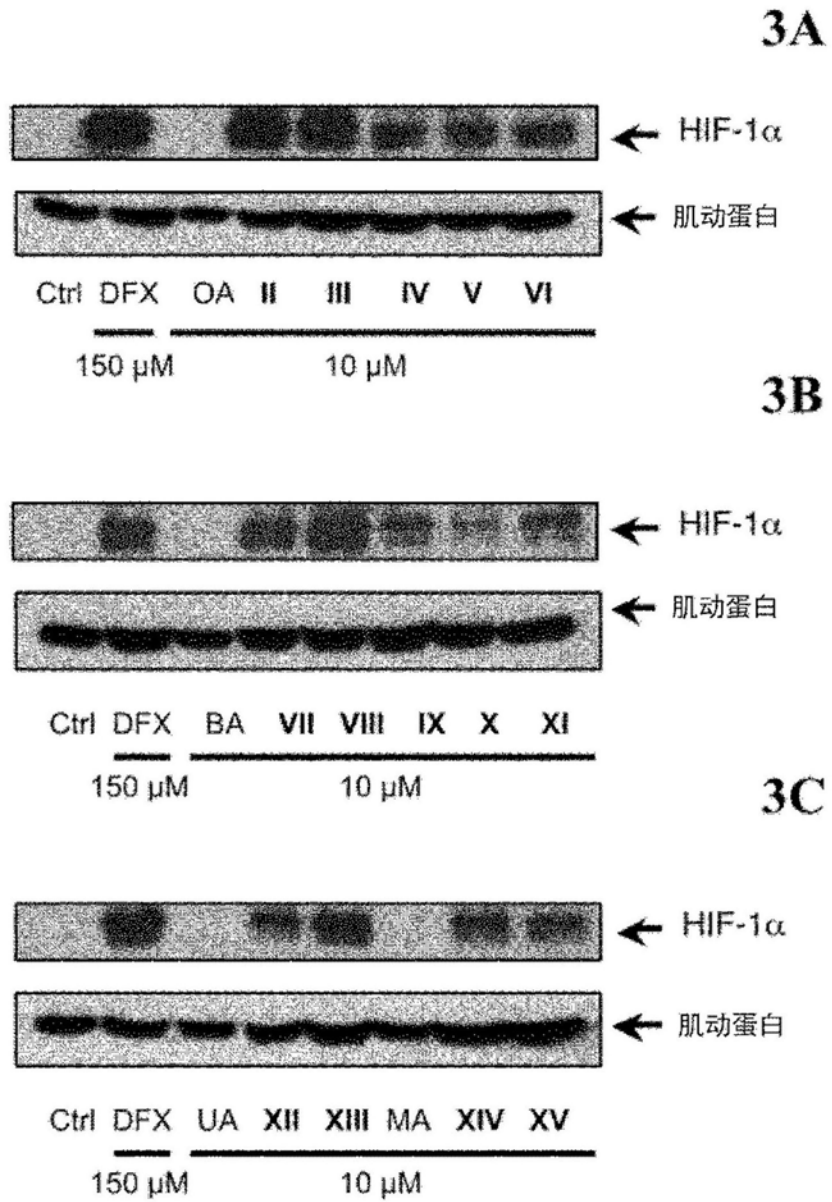


图3

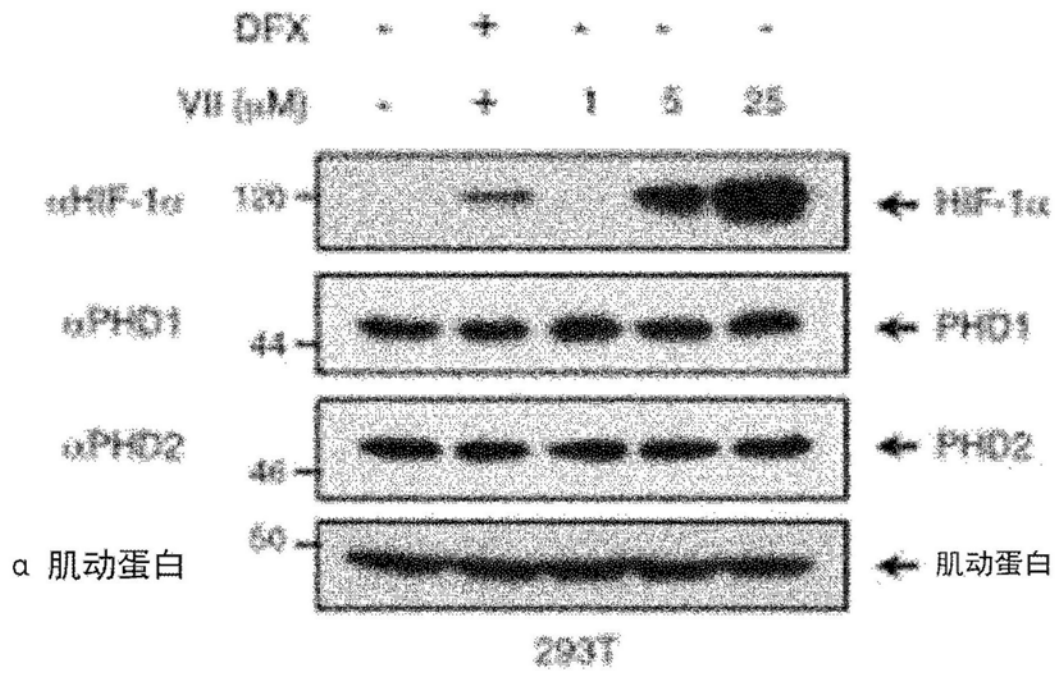


图4

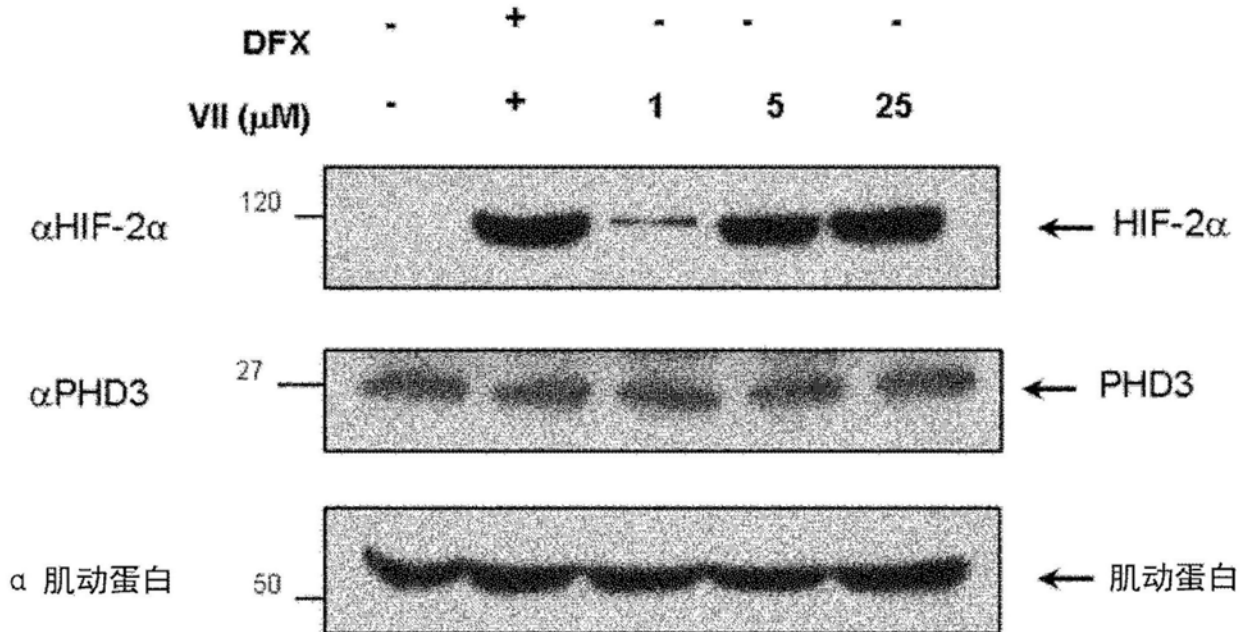


图5

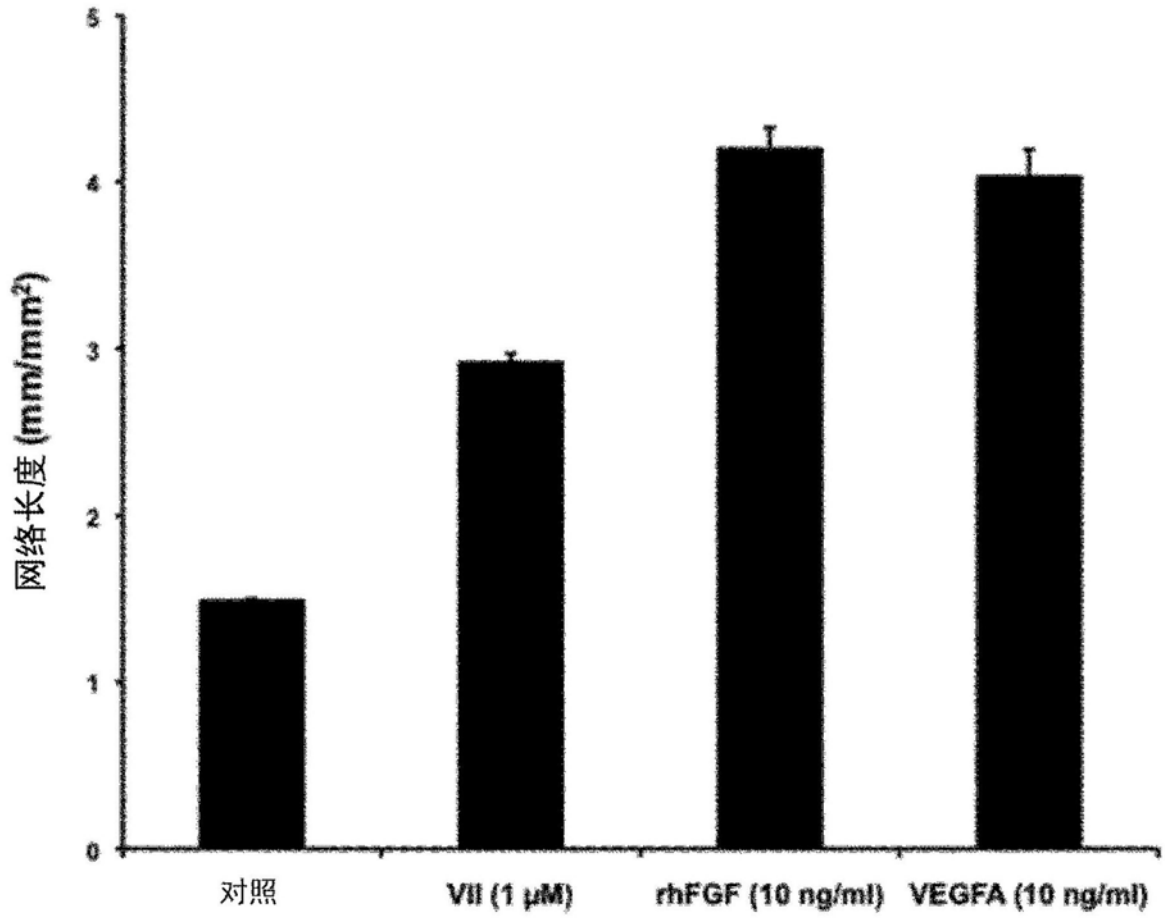


图6

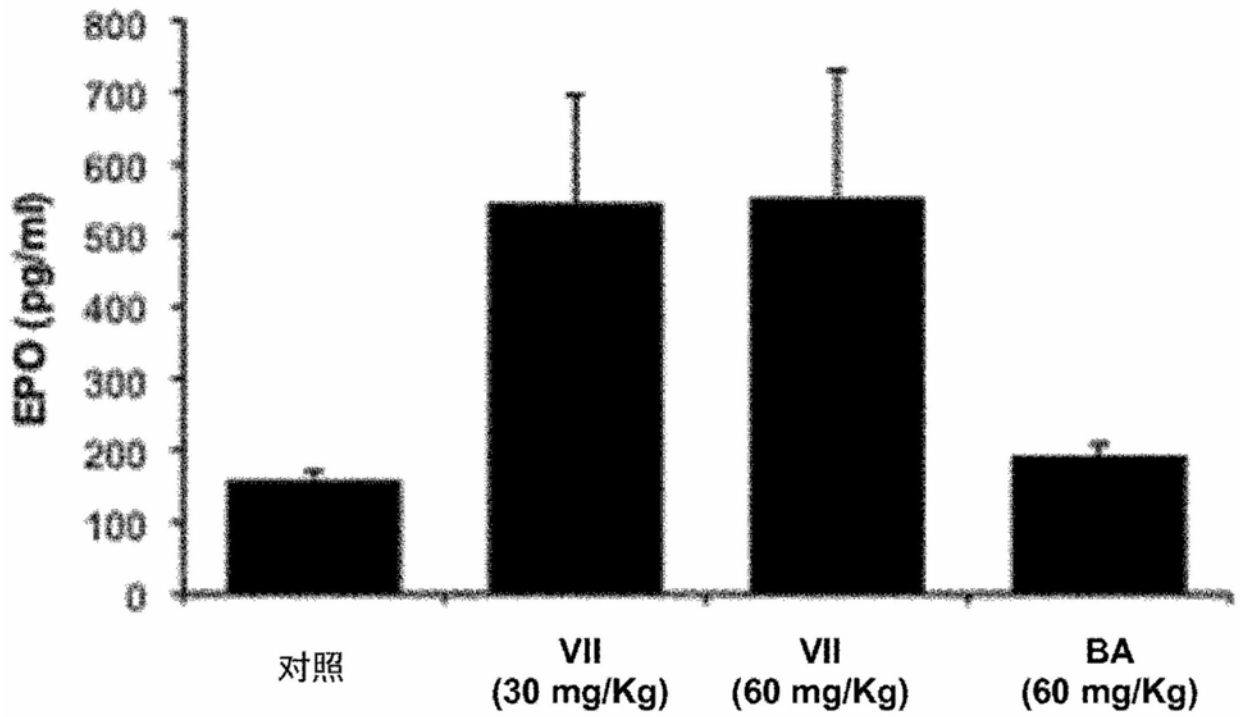


图7

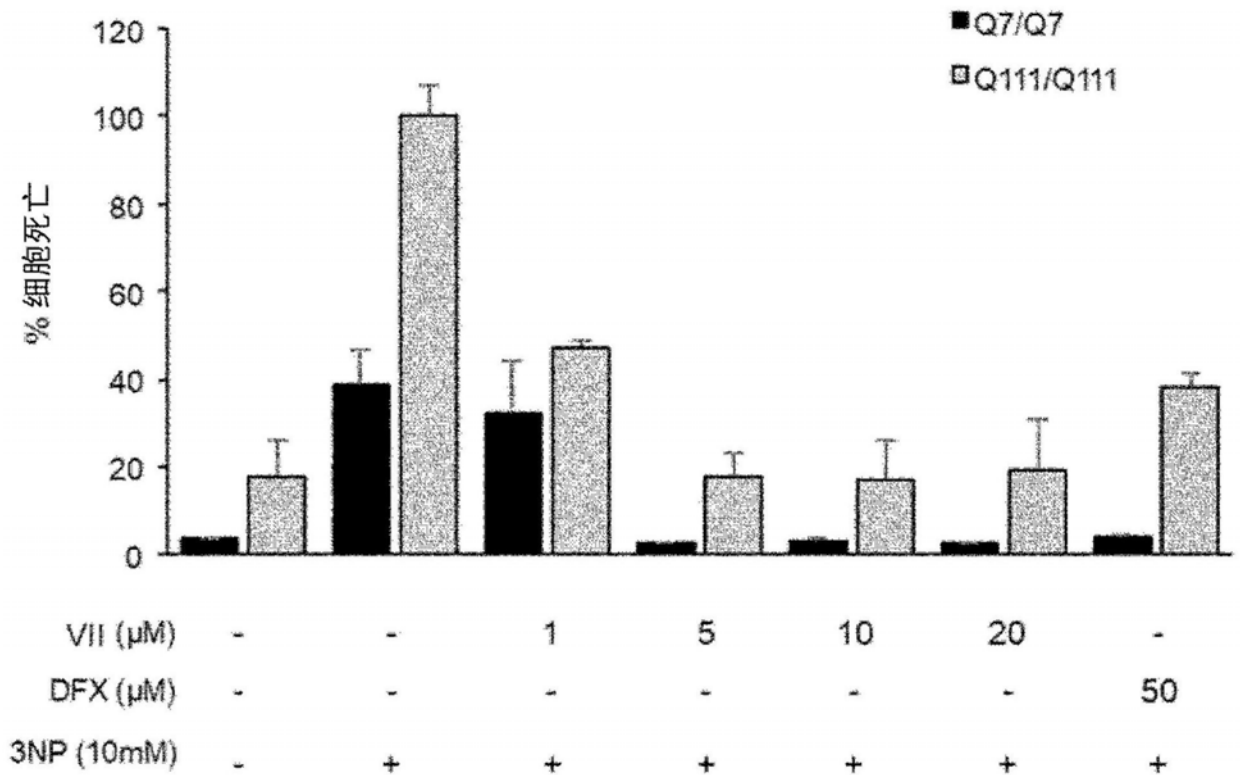


图8

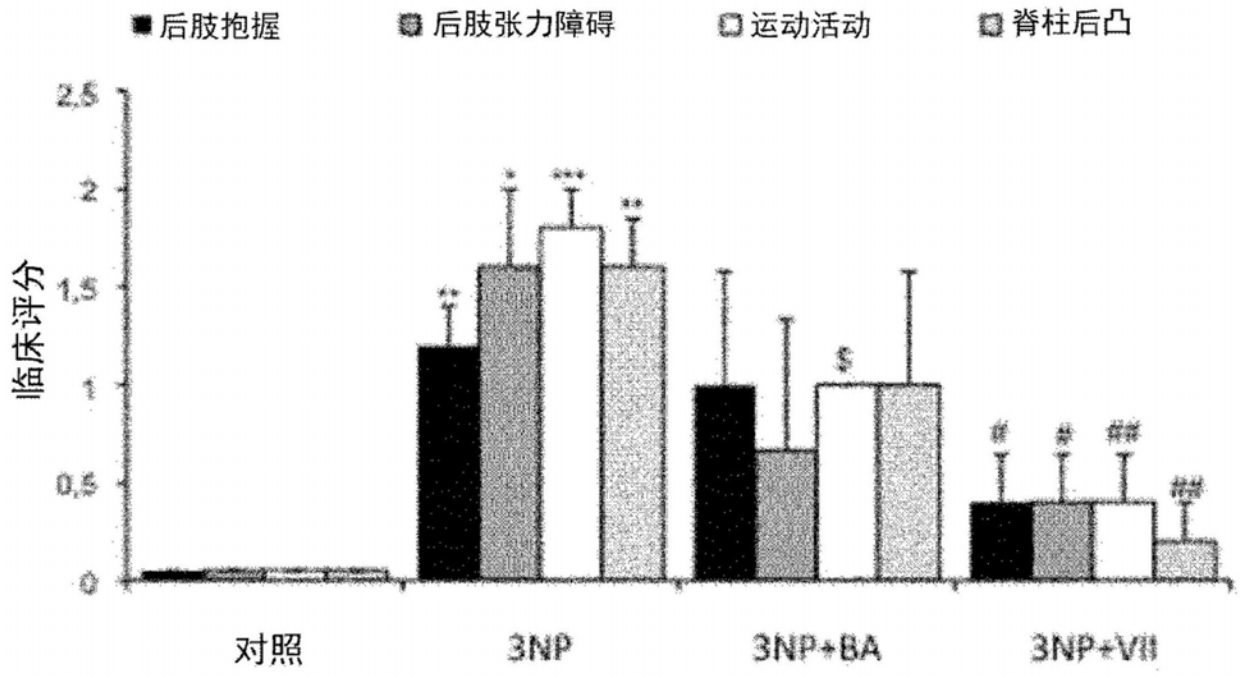


图9

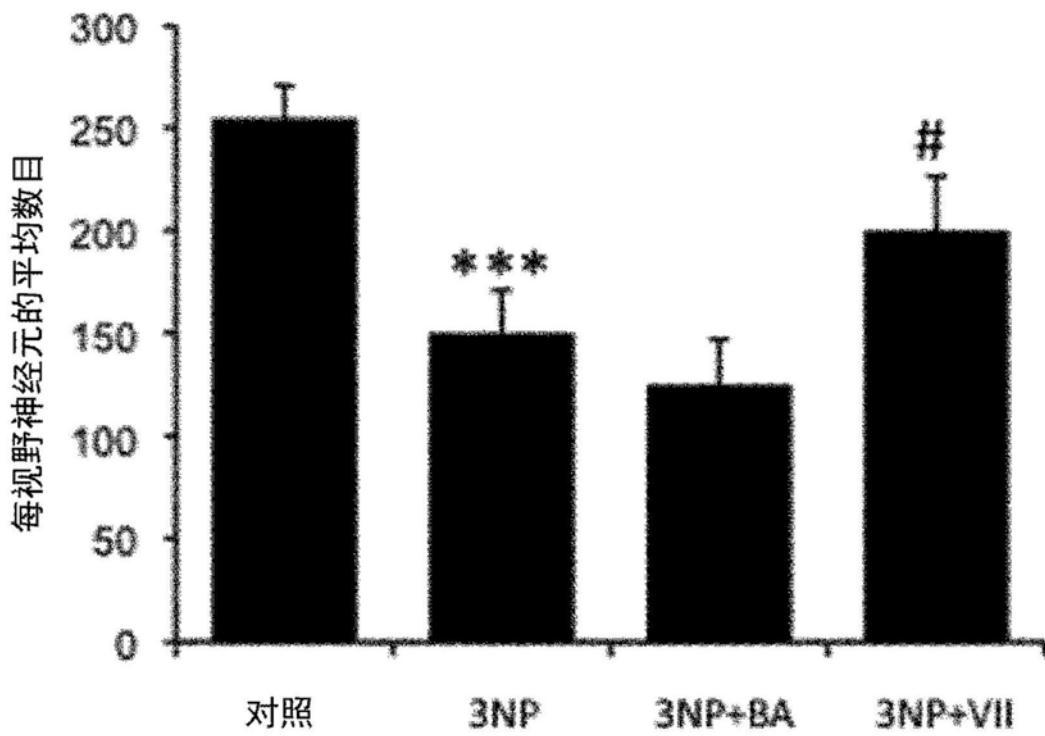


图10

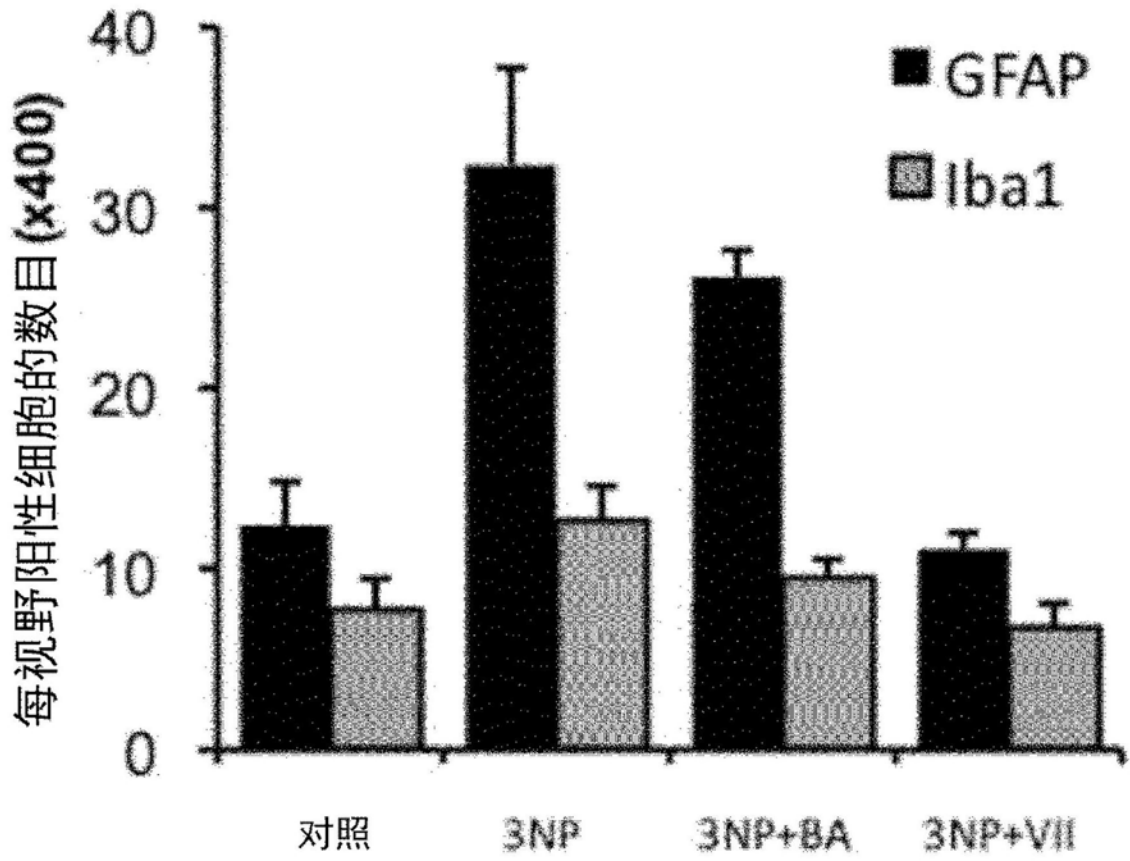
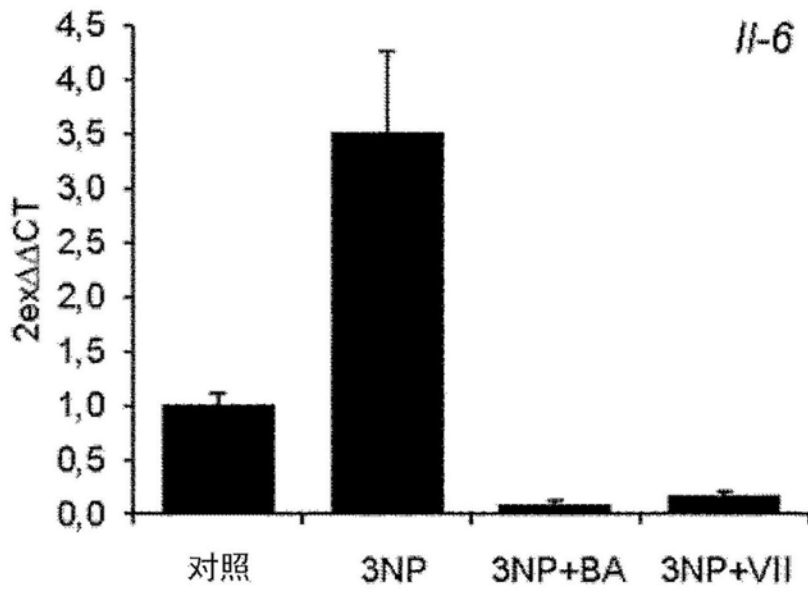


图11

12A



12B

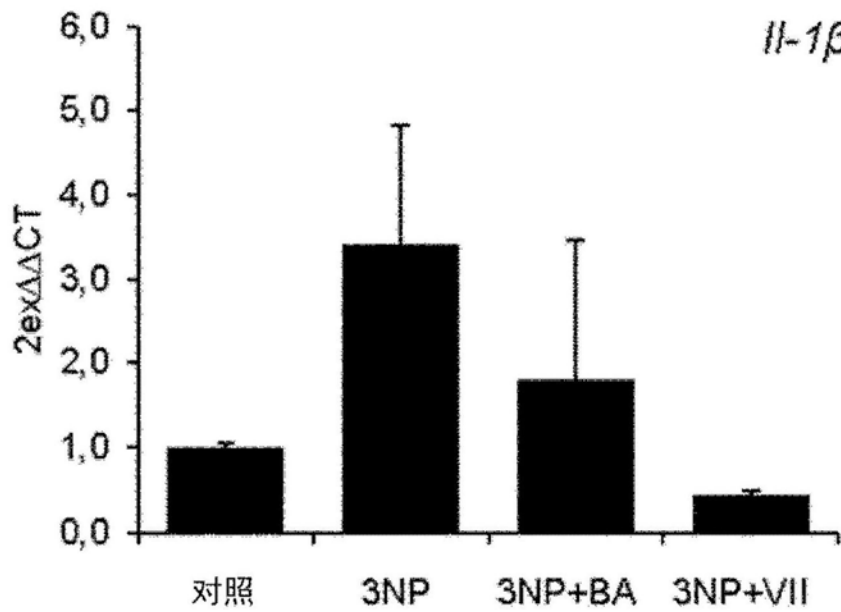
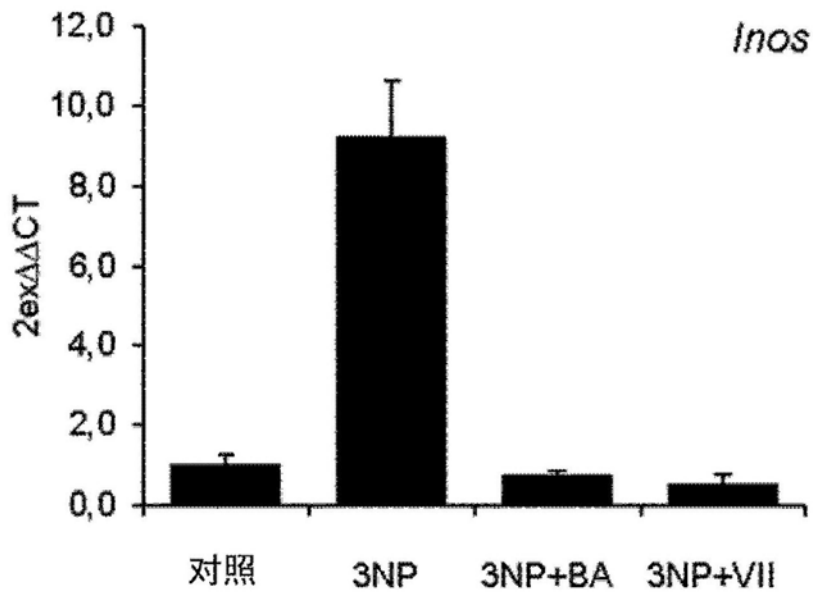


图12

12C



12D

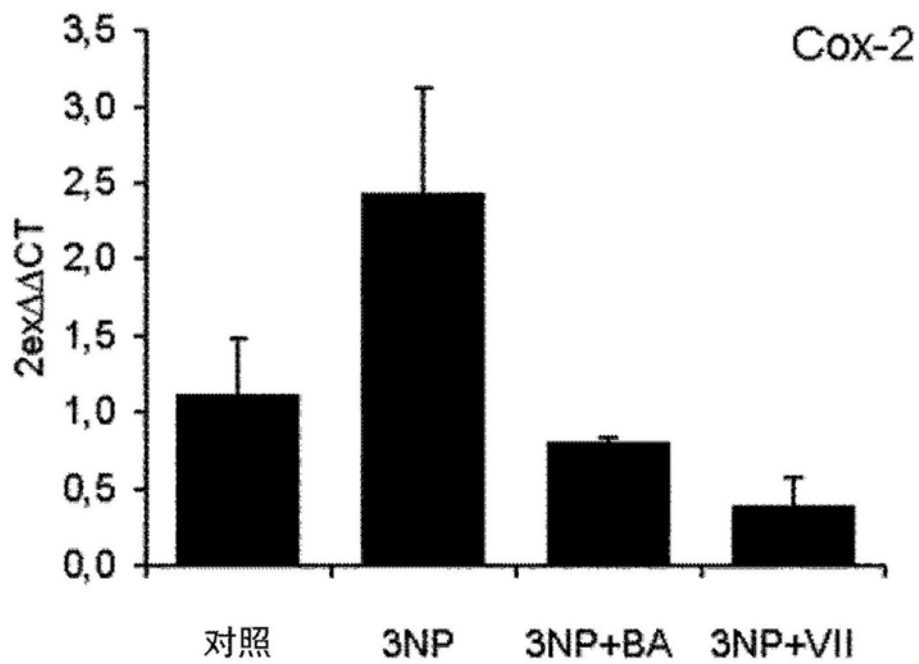
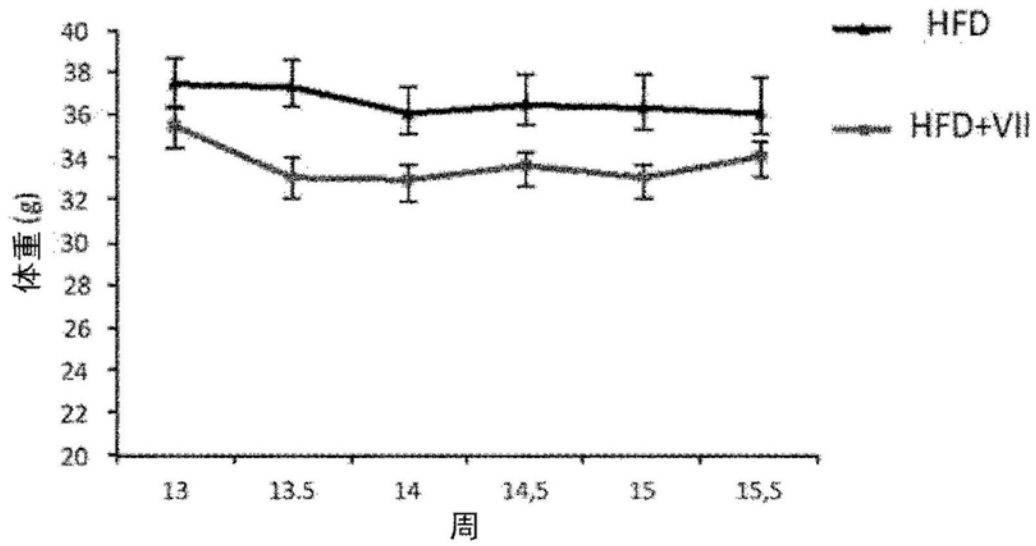
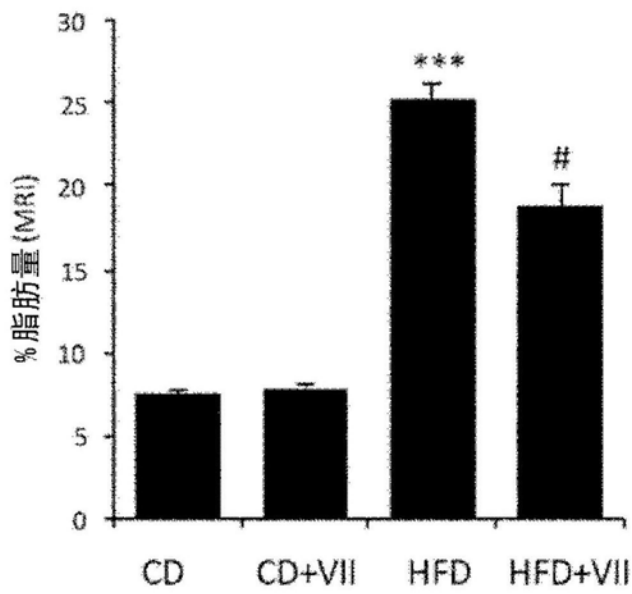


图12(续)

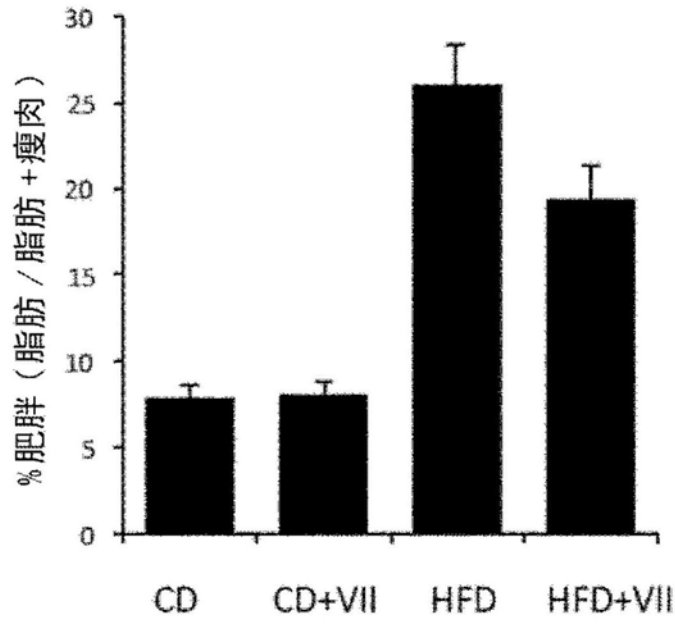


13A



13B

图13



13C

图13(续)

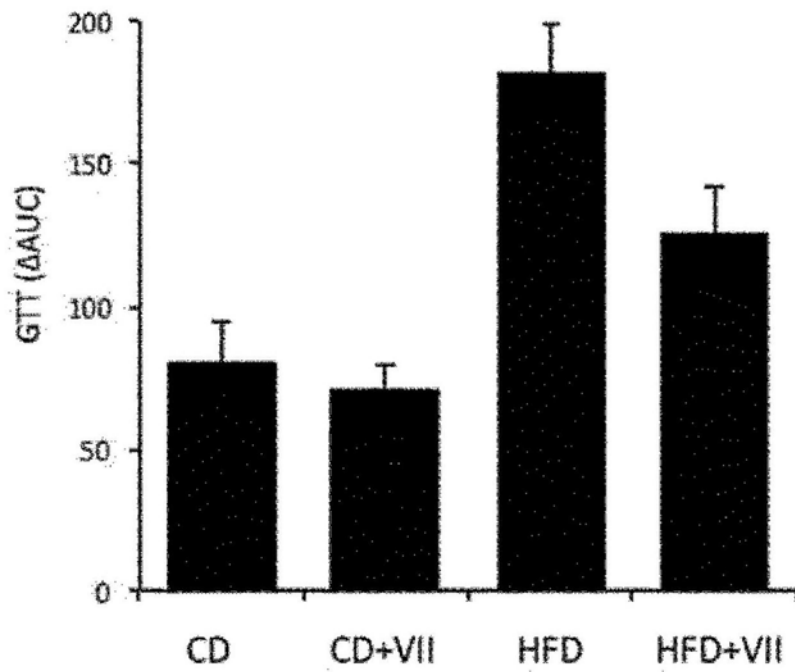


图14

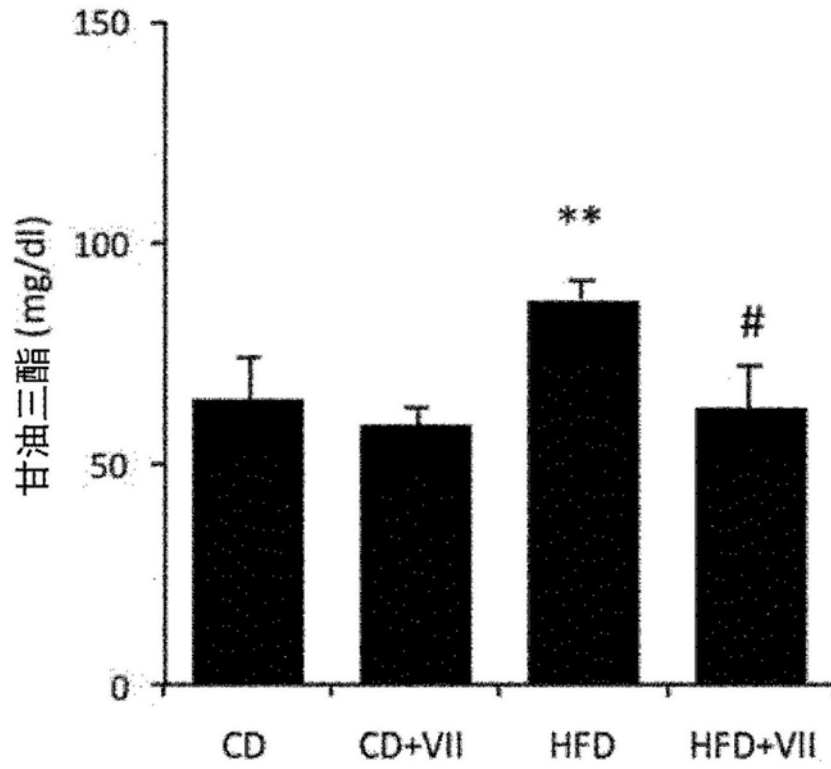


图15