



(10) 授权公告号 CN 116406264 B

(45) 授权公告日 2025. 07. 11

(21) 申请号 202180057812.8

(22) 申请日 2021.07.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116406264 A

(43) 申请公布日 2023.07.07

(30) 优先权数据
10-2020-0096595 2020.08.03 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2021/009884 2021.07.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/030879 KO 2022.02.10

(73) 专利权人 细胞离子生物学株式会社
地址 韩国大田市儒城区科技4路17大德商
务中心A栋407号

(72) 发明人 金成镇 徐石效

(74) 专利代理机构 北京汇信合知识产权代理有限公司 11335

专利代理师 林聪源

(51) Int.Cl.
A61K 31/27 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Michael J. Thorpy. Recently Approved and Upcoming Treatments for Narcolepsy. CNS Drugs. 2020, 第34卷 (第9期), 9-27.

Lucie Barateau 等. Narcolepsy Type 1 as an Autoimmune Disorder: Evidence, and Implications for Pharmacological Treatment. CNS Drugs. 2017, 第31卷 (第10期), 821-834.

审查员 张娜

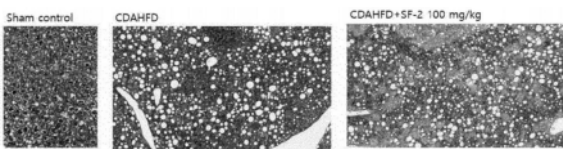
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

包含苯基烷基氨基甲酸酯化合物的可治疗KCa3.1通道介导性疾病的组合物

(57) 摘要

本发明涉及包含苯基烷基氨基甲酸酯化合物的可治疗K_{Ca}3.1通道介导性疾病的组合物,进一步具体地,将目前用作嗜睡症治疗剂的索里亚姆菲托(solriamfetol)即以2-氨基-3-苯基丙基氨基甲酸酯为代表的苯基烷基氨基甲酸酯化合物作为有效成分包含,可以抑制细胞膜中K_{Ca}3.1通道活性,进而可用于治疗K_{Ca}3.1通道介导性疾病,如纤维化疾病、自身免疫性疾病以及癌症的医药组合物。



1. 一种组合物在制备治疗KCa3.1通道介导性疾病的药物中的用途,其特征在于,所述组合物为(R)-2-氨基-3-苯基丙基氨基甲酸酯盐酸盐;
所述K_{Ca}3.1通道介导性疾病是包括肝纤维化或肺纤维化的纤维化疾病。

包含苯基烷基氨基甲酸酯化合物的可治疗 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含苯基烷基氨基甲酸酯化合物的可治疗 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病的组合物,具体是,将现有用作嗜睡症治疗药物的索里亚姆菲托(solriamfetol)即以2-氨基-3-苯基乙基氨基甲酸叔丁酯为代表的苯基烷基氨基甲酸酯化合物作为有效成分含有,在细胞膜中抑制 $K_{Ca}3.1$ 通道表达,进而可作为治疗 $K_{Ca}3.1$ 介导性疾病例如纤维化疾病、自身免疫性疾病以及癌症疾病用途的医药组合物。

背景技术

[0002] $K_{Ca}3.1$ 通道在人体内分布于作为不可兴奋细胞(non-excitabile cells)的成纤维细胞、肝星状细胞、血管内皮细胞、神经细胞、癌细胞、免疫细胞(T cells、B cells)等。通常而言, K^+ 通道通过膜电位超极化,增加 Ca^{2+} 的细胞内流入,从而发挥激活细胞的作用。但 Ca^{2+} 是作为第二信使(second messenger)或者细胞内多种酶的辅因子(co-factor)发挥作用,对细胞内的信号传递过程发挥非常重要的作用。因此 $K_{Ca}3.1$ 通道被激活,细胞内的 Ca^{2+} 增加,促进细胞增殖、上皮细胞间质转型(epithelial-mesenchymal transition)、细胞迁移(migration)、细胞外基质(extracellular matrix)或者氧化氮等物质的生产及分泌。

[0003] 成肌纤维细胞(或者被激活的肝星状细胞)形成是纤维化过程中最重要的阶段,通过上皮细胞间质转型发生。成肌纤维细胞形成,肝星状细胞被激活以后,这些细胞的增殖变得活跃,在该细胞中产生细胞外基质形成,使纤维化变得活跃。据悉,从血管内皮细胞或者上皮细胞等形成成肌纤维细胞的上皮细胞间质转型是 Ca^{2+} -依赖性的过程。而且通过纤维化诱发因子即 TGF_{β} 的上皮细胞间质转型尤其对 Ca^{2+} 敏感。 $K_{Ca}3.1$ 通道是可以调节成肌纤维细胞和肝星状细胞等细胞内的 Ca^{2+} ,进而调节上皮细胞间质转型。

[0004] $K_{Ca}3.1$ 通道被激活以后,根据这些 K^+ 通道表达的细胞发生其它反应。通过免疫细胞,进一步通过免疫细胞增殖和细胞因子的分泌等增加炎症以及免疫反应。通过血管内皮细胞促进血管生成,通过氧化氮的分泌,诱发血管舒张。通过成纤维细胞和肝星状细胞诱发纤维化疾病。进一步,生成成肌纤维细胞(myofibroblasts)或者激活肝星状细胞,诱发胶原蛋白等细胞外基质的生成等,进而促进结缔组织(connective tissue)的形成。此外对一部分癌细胞增殖及转移也发挥重要作用。因此可以推断, $K_{Ca}3.1$ 通道对炎症及自身免疫性疾病、纤维化疾病以及癌症的发展发挥非常重要的作用。

[0005] 细胞因子和 H_2O_2 等炎症诱发因子(pro-inflammatory agents)可以加重免疫细胞增殖等免疫及炎症反应,包含如 TGF_{β} 和PDGF等生长因子的纤维化诱发因子(pro-fibrotic agents)可以加重纤维化反应。但这些炎症诱发因子和纤维化诱发因子会增加 $K_{Ca}3.1$ 通道的表达。进一步,由于炎症诱发因子和纤维化诱发因子引发的炎症、免疫反应以及纤维化反应加重的过程中, $K_{Ca}3.1$ 通道表达的增加有着重要作用。

[0006] 如上所述, $K_{Ca}3.1$ 通道的表达增加时,会加快纤维化疾病和癌症等增殖性疾病、自身免疫性疾病等炎症疾病等发展。因此将这些疾病归类为 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病。近来,为

利用K_{Ca}3.1通道抑制药物研发出炎症及自身免疫性疾病、纤维化疾病以及癌症治疗药物,一直坚持不懈地做出努力。其中比较具有代表性的K_{Ca}3.1抑制剂即塞尼卡泊(senicapoc)作为镰状细胞贫血视网膜病变(sickle cell anemia)以及各种炎症和自身免疫性疾病、纤维化疾病治疗药物正在处于开发中。

[0007] 本发明人曾经在梨花女子大学产学协作团的美国专利US 9,259,412 B2及作为其同族专利的韩国注册专利第10-1414831号中提出过,将目前作为嗜睡症(narcolepsy)治疗剂使用的莫达非尼(modafinil)及其衍生物作为有效成分含有的K_{Ca}3.1通道介导性疾病的预防或治疗用组合物。在此,作为K_{Ca}3.1通道介导性疾病的预防或治疗用组合物,提出了镰状细胞贫血视网膜病变、包括急性免疫反应或自身免疫性疾病的免疫疾病、包括前列腺癌或胰腺癌的癌症、创伤性脑损伤、神经退行性疾病、分泌性腹泻等作为示例。

[0008] 另外,索里亚姆菲托(solriamfetol)即2-氨基-3-苯基丙基氨基甲酸酯(2-amino-3-phenylpropyl carbamate)是作为嗜睡症治疗剂,由韩国SK公司以“盐酸索利氨酯(Sunosi)”的产品名称进行开发销售。关于此,SK公司的美国专利US 5,955,499B2和US 6,140,532 B2以及这些同族专利即韩国注册专利第10-197892号和第10-173863号中介绍,索里亚姆菲托及其衍生物作为中枢神经系统治疗剂尤其抗抑郁药和抗焦虑药有用。

[0009] 美国专利US9,464,041 B2及作为其同族专利的韩国公开专利第10-2019-105675号中公开,使用索里亚姆菲托及其衍生物治疗或预防抑郁症、癌症、多发性硬化症、帕金森病、阿尔茨海默病、慢性疲劳、纤维肌痛症(fibromyalgia)、慢性疼痛症、外伤性脑损伤、AIDS及骨关节炎等疾病伴随的疲劳的方法,美国专利US10,351,517 B2及作为其同族专利的韩国注册专利第10-1335941号中公开了包括白天过度嗜睡(excessive daytime sleepiness)以及病理性嗜睡(pathological somnolence)的睡眠-觉醒障碍(sleep-wake disorder)的治疗方法。

[0010] [在先技术文献]

[0011] [专利文献]

[0012] 美国专利US9,259,412B2(韩国注册专利第10-1414831号);

[0013] 美国专利US5,955,499B2(韩国注册专利第10-197892号);

[0014] 美国专利US6,140,532B2(韩国注册专利第10-173863号);

[0015] 美国专利US9,464,041B2(韩国公开专利第10-2019-105675);

[0016] 美国专利US10,351,517B2(韩国注册专利第10-1335941号)。

发明内容

[0017] 技术问题

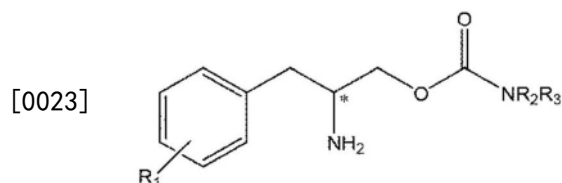
[0018] 本发明人是在使用可抑制K⁺通道的物质,对治疗K_{Ca}3.1通道介导性疾病的预防或治疗用组合物进行研究的过程中惊异地发现,目前包含用作嗜睡症治疗剂的索里亚姆菲托的苯基烷基氨基甲酸酯化合物可以抑制K_{Ca}3.1通道的表达,并通过多种实验用事实证明这些可能性,从而完成了本发明。

[0019] 因此,本发明的目的在于,提供将所述苯基烷基氨基甲酸酯化合物作为有效成分包含的新的可治疗K_{Ca}3.1通道介导性疾病的组合物。

[0020] 技术方案

[0021] 根据本发明的可治疗 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病的组合物是,优选地,包含以下述[结构式1]表示的苯基烷基氨基甲酸酯化合物或者其药学上可接受的盐,作为有效成分。

[0022] [结构式1]



[0024] 所述[结构式1]中, R_1 是选自氢、卤、羟基、胺、硝基、硫化氢、甲基、甲基卤素、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基、乙烯基、芳基中的一个或两个官能团, R_2 和 R_3 是分别选自氢、甲基、乙基、丙基、酰胺中的一个官能团,*符号表示手性中心。

[0025] 根据本发明的可治疗 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病的组合物是,优选地,所述[结构式1]中,包括 R_2 和 R_3 为氢的化合物。

[0026] 根据本发明的可治疗 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病的组合物是,优选地,所述[结构式1]中,包括 R_1 为选自氢、F、Cl、Br、I中的一个或两个官能团的化合物。

[0027] 根据本发明的可治疗 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病的组合物是,优选地,所述[结构式1]中,包括 R_1 为一个或两个F, R_2 和 R_3 是分别选自氢、甲基、酰胺中的一个官能团的化合物。

[0028] 优选地,以所述[结构式1]表示的化合物是,R-同分异构体或S-同分异构体含量达90%以上的手性化合物。

[0029] 优选地,以所述[结构式1]表示的化合物是,选自2-氨基-3-苯基丙基氨基甲酸酯、2-氨基-3-(3-氟苯基)氨基甲酸丙基酯、2-氨基-3-(3,4-二氯苯基)氨基甲酸丙基酯、2-氨基-3-苯基丙基氨基甲酸甲酯、2-氨基-3-苯基丙基(氨基羰基)氨基甲酸酯、2-氨基-3-(4-羟基苯基)丙基氨基甲酸酯、2-氨基-3-[3-(三氟甲基)苯基]丙基氨基甲酸酯中的某一个。

[0030] 优选地,所述 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病是包括肝纤维化及肺纤维化的纤维化疾病、自身免疫性疾病以及癌症。

[0031] 有益效果

[0032] 本发明的结构式1化合物是在以成纤维细胞为对象的体外实验中被证明具有抑制 $K_{Ca}3.1$ 通道表达的效果,以及抑制炎症和纤维化的效果,进一步,在对于诱发肝病的小鼠模型的体内实验中被证明具有抑制炎症及纤维化的效果。

[0033] 因此预期所述结构式1化合物可以作为治疗人体内发生的 $K_{Ca}3.1$ 通道介导性疾病即各种炎症以及自身免疫性疾病、纤维化疾病以及癌症的新型医药组合物被有效使用,根据需求,也可以开发成动物用药品。

附图说明

[0034] 图1是显示本发明的结构式2化合物对成纤维细胞中 $K_{Ca}3.1$ 电流产生的效果;

[0035] 图2是显示本发明的结构式3至8化合物对成纤维细胞中 $K_{Ca}3.1$ 电流产生的效果;

[0036] 图3是显示在诱发炎症的LPS(脂多糖, lipopolysaccharides)中暴露24小时的成纤维细胞中本发明的结构式2至8化合物对炎症标志物的表达产生的效果;

[0037] 图4是显示在诱发纤维化的 TGF_β 中暴露24小时的成纤维细胞中本发明的结构式2至8化合物对纤维化标志物的表达产生的效果;

[0038] 图5是显示以对胶原蛋白的马松三色染色法 (Masson's trichrome) 确认在被博来霉素 (bleomycin) 诱发纤维化的小鼠模型中本发明的结构式2化合物抑制纤维化效果的结果;

[0039] 图6是显示在被博来霉素诱发肺纤维化的小鼠模型中本发明的结构式2化合物对纤维化标志物即mRNA表达产生的影响;

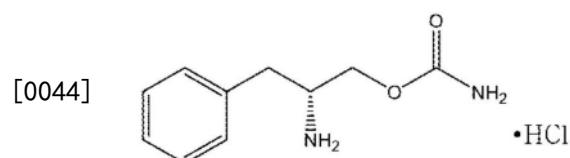
[0040] 图7是显示以对胶原蛋白的马松三色染色法 (Masson's trichrome) 确认在被在CDAHFD饲料诱发肝纤维化的小鼠模型中本发明的结构式2化合物抑制纤维化效果的结果;

[0041] 图8是显示在被CDAHFD饲料诱发肝纤维化的小鼠模型中本发明的结构式2化合物对纤维化标志物mRNA表达产生的影响。

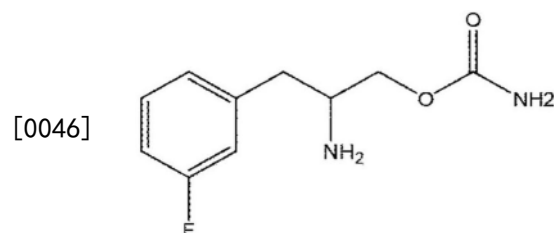
具体实施方式

[0042] 本发明的所述结构式1的苯基烷基氨基甲酸酯化合物是具体包括以下结构式2至结构式8的化合物。

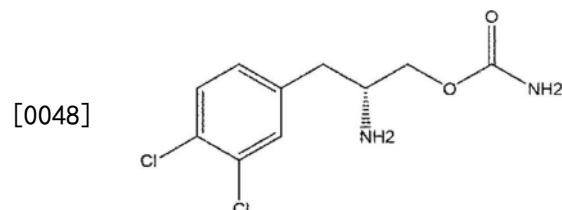
[0043] [结构式2]



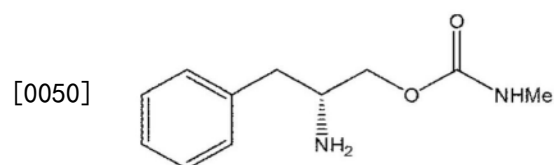
[0045] [结构式3]



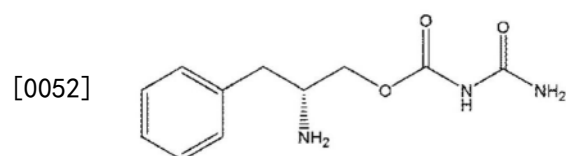
[0047] [结构式4]



[0049] [结构式5]

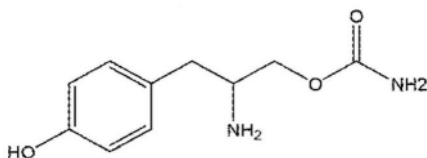


[0051] [结构式6]



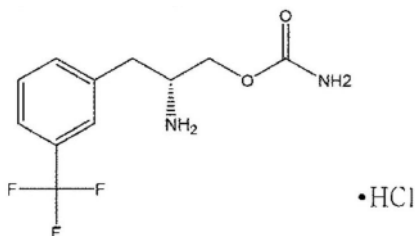
[0053] [结构式7]

[0054]



[0055] [结构式8]

[0056]



[0057] 所述结构式2至结构式8化合物的化学名称和本发明人编写的代表名称如下。

[0058] [表1]

[0059]

结构式	化学名称	代码名
2	(R)-2-氨基-3-苯基丙基氨基甲酸酯盐酸盐 (R)-2-amino-3-phenyl propylcarbamate hydrochloride	SF-2
3	2-氨基-3-(3-氟苯基)氨基甲酸丙基酯 2-amino-3-(3-fluorophenyl)propylcarbamate	SF-3
4	(2R)-2-氨基-3-(3,4-二氯苯基)氨基甲酸丙基酯 (2R)-2-amino-3-(3,4-dichlorophenyl)propylcarbamate	SF-4
5	(2R)-2-氨基-3-苯基丙基氨基甲酸甲酯 (2R)-2-amino-3-phenylpropyl methylcarbamate	SF-5
6	(2R)-2-氨基-3-苯基丙基(氨基羰基)氨基甲酸酯 (2R)-2-amino-3-phenylpropyl(aminocarbonyl)carbamate	SF-6
7	2-氨基-3-(4-羟基苯基)丙基氨基甲酸酯 2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propylcarbamate	SF-7
8	(2R)-2-氨基-3-[3-(三氟甲基)苯基]丙基氨基甲酸酯盐酸盐/ (2R)-2-amino-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propylcarbamate hydrochloride	SF-8

[0060]

[0061] 所述结构式2化合物是一般称为索里亚姆菲托(solriamfetol),目前被作为嗜睡症的治疗剂使用。所述结构式3化合物的制造方法是,已在美国专利US 6,140,532 B2和作为同族专利的韩国注册专利的第10-173863号中公开,所述结构式4化合物是可以根据美国公开专利US 2005/0080268 A1中描述的方法制备。

[0062] 所述结构式5化合物的制造方法是已在美国专利US 5,705,640 B2公开,所述结构式6化合物的制造方法是已在美国专利US 9,403,761 B2或者作为其同族专利的韩国公开专利第10-2016-0126988号中公开,所述结构式7化合物是可以根据美国专利US 6,140,532 B2的[实施例9]和国际公开专利W0 98/15526的[实施例9]中描述的方法制备。

[0063] 所述结构式8化合物是,可以按照拜尔申请的美国专利US 9,180,120 B2或者作为其同族专利的韩国公开专利第10-2013-0138216号的[实施例48A]中描述的方法制备。

[0064] 作为参考,所述拜尔专利中描述,所述结构式8化合物可以用于肝硬化等疾病。但

所述拜尔专利中,所述结构式8化合物作为V1a、V2受体拮抗剂,抑制抗利尿激素即血管加压素的作用,其目的在于,治疗心功能不全,通过肾脏、血液动力学效果,治疗心血管障碍以及肝硬化等疾病。

[0065] 反之,本发明中,其目的在于所述结构式8化合物抑制 $K_{Ca}3.1$ 通道的表达,以解决发生纤维化的直接原因,因此本发明与通过所述拜尔专利附带产生的肝硬化治疗具有明显的差异。

[0066] 本发明的药物组合物包含所述结构式1化合物的在药学上可接受的盐。在此,“药学上可接受的盐”是指,通常可以包括金属盐、有机碱盐、无机酸盐、有机酸盐、碱性或酸性氨基酸盐等。

[0067] 本发明的药物组合物是将所述结构式1化合物的溶剂化物及水合物全部包括,包括外消旋盐和所有可能的立体异构体,进一步可以包括各化合物的结晶形态或者非结晶形态。

[0068] 本发明的药物组合物是可以利用通常方法,制成片剂、丸剂、酸剂、颗粒剂、胶囊剂、悬浮剂、内容液剂、乳剂、糖浆剂、气雾剂、无菌注射液等形态的剂型。而且可以根据使用目的,可以口服给药或者非口服给药,非口服给药时,可以选择皮肤外用或者腹腔注射、直肠注射、皮下注射、静脉注射、肌肉注射或者胸部注射注入方式。

[0069] 本发明的药物组合物的给药量是可以根据患者的体重、年龄、性别、健康状态、饮食、给药时间、给药方法、排泄率及疾病的重症程度发生变化。优选的一日给药量是,以有效成分为准,可以给药0.2至20mg/kg,进一步优选的是,可以给药0.5至10mg/kg,一天给药一次至二次,但并不限于此。

[0070] 下面说明本发明的有关苯基烷基氨基甲酸酯化合物的药理效果。

[0071] 1) 实验方法

[0072] 1-1) 培养成纤维细胞

[0073] 在杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Hyclone, Logan, UT)中培养成纤维细胞(CRL-2795; American Type Culture Collection, VA)。所有细胞在5%的二氧化碳湿式条件下保持在37°C。将如此培养的成纤维细胞分别在引发炎症物质即LPS(脂多糖, lipopolysaccharides)和,作为纤维化诱发因子的 TGF_{β} ,以及本发明的结构式2至8化合物(以下称之为SF-2至SF-8化合物)中暴露24小时后,对该抗炎症及抗纤维化效果进行了测试。

[0074] 1-2) 建立肺纤维化小鼠模型

[0075] 为了验证本发明的SF-2化合物的抑制纤维化效果,实施了如下实验。首先,将C57BL/6自然小鼠(购自东方生物)以每组6~8只分成三组后,分别作为疾病诱发组和给药组以及正常对照组使用。对于各组的试验对象小鼠如下进行了处理。

[0076] (1) 疾病诱发组:在受试对象小鼠的气道内注入博来霉素(bleomycin)1.5单位,诱发肺纤维化。此外,将与给下述给药组注入的SF-2化合物同样量的蒸馏水按一周五次进行腹腔注射(100mg/kg)。附图中BLM(博来霉素)则表示这种疾病诱发组。

[0077] (2) 给药组:在受试对象小鼠的气道内注入博来霉素1.5单位,然后将本发明的SF-2化合物按一周五次进行腹腔注射(100mg/kg)。

[0078] 附图中BLM+SF-2则表示这些给药组。

[0079] (3) 正常对照组:在气道内注入与给所述疾病诱发组注入的博来霉素同样量的蒸馏水。此外,将与给所述给药组注入的SF-2化合物同样量的蒸馏水,按一周五次进行腹腔注射。附图中C或者Control (对照) 则表示这种正常对照组。

[0080] 将各组的小鼠模型按所述的方法,利用四周时间进行药物处理后,注入过量的麻醉剂即刻致死,然后摘出肺,用于以下试验。

[0081] 1-3) 建立脂肪肝疾病小鼠模型

[0082] 为了验证本发明的SF-2化合物对肝炎及纤维化产生的治疗效果,实施了如下实验。首先,将C57BL/6自然小鼠(购自东方生物)以每组6~8只分成三组后,分别作为疾病诱发组和给药组以及正常对照组使用。对于各组的试验对象小鼠如下进行了处理。

[0083] (1) 疾病诱发组:对受试对象小鼠用CDAHFD饲料(choline deficient, L-amino-acid-defined, high-fat diet with 0.1% methionine, A06071302, Research Diets, New Brunswick, NJ) 饲养,诱发了脂肪肝疾病及纤维化。此外,用口管将与给下述给药组注入的SF-2化合物同样量的蒸馏水按一周五次进行给药。附图中CDAHFD则表示这种疾病诱发组。

[0084] (2) 给药组:对受试对象小鼠,将本发明的SF-2化合物与所述CDAHFD饲料一起给药,一周五次(100mg/kg/day)。附图中CDAHFD+SF-2是表示这些给药组。

[0085] (3) 正常对照组:用正常饲料饲养受试对象小鼠。此外,利用口管将与给所述给药组给药的SF-2化合物相同的量的蒸馏水一周给药五次。附图中C或Control表示这些正常对照组。

[0086] 对各组的小鼠模型按所述的方法,利用16周的时间进行药物处理后,给药过量的麻醉剂即刻致死,摘出肝,用于以下试验。

[0087] 1-4) 肺及肝组织的石蜡组织标本制作与形态变化观察

[0088] 用多聚甲醛溶液将从所述小鼠模型中摘出的肺和肝组织固定以后,切割成1至2mm的厚度。将切割的组织用石蜡包埋后,切成4 μ m的厚度,再用二甲苯除去石蜡,然后用乙醇除去二甲苯,再用自来水清洗制成石蜡组织标本。

[0089] 所述肺和肝组织中对纤维化标志物即胶原蛋白的免疫组织化学染色(immunohistochemistry)是用马松三色(Masson's trichrome)染色法实施。

[0090] 1-5) 实时聚合酶连锁反应(Real time PCR) 分析

[0091] 在所述小鼠模型中摘出的肺和肝组织中,通过实时聚合酶连锁反应测定了炎症或纤维化因子的mRNA表达程度。将所述组织的RNA以TRIzol试剂(Molecular Research Center, Cincinnati, OH) 提取,使用BcaBEST聚合酶(Takara Shuzo) 合成单链cDNA以后,实施聚合酶连锁反应。

[0092] 此时使用的炎症诱发细胞因子及纤维化标志物的引物序列(序列号1至30) 如下表1及表3所示。

[0093] [表2] 诱发炎症的细胞因子引物序列

	正链	序列号	无义链	序列号
TNF α	F-CCCCAAAGGGATGAGAAGT T	5	R-CACTTGGTGGTTTGCTAC GA	6
CCL2	F-CCCCAAGAAGGAATGGGTC C	7	R-TGCTTGAGGTGTTTGTGG AA	8
IL1 α	F-GAGCCGGGTGACAGTATCA G	11	R-ACTTCTGCCTGACGAGCT TC	12
IL6	F-ACCAGAGGAAATTTTCAAT A GGC	13	R-TGATGCACTTGCAGAAAA CA	14
mGAPD H	F-CCGTATTGGGCGCCTGGTCA	19	R-CCGGCCTTCTCCATGGTG GT	20

[0095] [表3]纤维化标志物引物序列

	正链	序列号	无义链	序列号
Coll α	F-ACAGTCCAGTTCTTCATTG C	21	R-GCACTCTTCTCCTGGTCC TG	22
α -SMA	F-CTGACAGAGGCACCACTG AA	31	R-CATCTCCAGAGTCCAGCA CA	32
mGAPDH	F-CCGTATTGGGCGCCTGGT CA	33	R-CCGGCCTTCTCCATGGTG GT	34

[0097] 1-6) 电生理分析

[0098] 通过膜片钳技术 (patch-clamp technique) 测定了分离培养的单个成纤维细胞中通过细胞膜的电流 (whole cell current)。在全细胞电压钳 (whole-cell voltage clamp) 细胞中, 通过微玻璃电极施加从 -100mV 到 +100mV 的电压斜坡 (voltage ramp), 将所产生的电流通过放大器 (EPC-10, HEKA, Lambrecht, Germany) 放大以后, 以 1 至 4kHz 的标本提取率记录。

[0099] 标准外用液含 150mM 的 NaCl、6mM 的 KCl、1.5mM 的 CaCl₂、1mM 的 MgCl₂、10mM 的 HEPES、10mM 的葡萄糖、pH7.4 (用 NaOH 滴定), 微玻璃电极 (移液器) 溶液含 40mM 的 KCl、100mM 的 K-天冬氨酸、2mM 的 MgCl₂、0.1mM 的 EGTA、4mM 的 Na₂ATP、10mM 的 HEPES、pH7.2 (用 KOH 滴定) 溶液。移液管溶液中自由 Ca²⁺ 浓度是, 在 5mM 的 EGTA 存在下, 通过添加适量的 Ca²⁺, 调节至 1 μ M (以 CaBuf 计算, G.Droogmans、Leuven 和 Belgium)。

[0100] K_{Ca}3.1 电流是按如下方法分离。在全细胞电压钳细胞中通过玻璃电极注入 1 μ M 的 Ca²⁺, 施加用于激活 K_{Ca}3.1 电流的 1-乙基-2-苯并咪唑啉酮 (1-ethyl-2-benzimidazolinone; 1-EBIO, 100 μ M) 而记录的电流中, 将被 K_{Ca}3.1 通道抑制剂即 TRAM-34 (10 μ M) 抑制的电流判定为 K_{Ca}3.1 电流, 将记录的电流除以细胞静容量进行标准化。

[0101] 1-7) 统计分析

[0102] 实验结果是以平均值 $\pm$ 标准误差 (S.E.M) 表达。通过学生 t 检验 (Student's t-test) 进行统计分析, 以显著性水平 0.05 以下判定为具有显著性差异。

[0103] 2) 利用培养细胞的实验结果

[0104] 2-1) SF-2 化合物对 K_{Ca}3.1 电流产生的效果

[0105] 附图 1 是显示 SF-2 化合物对所述成纤维细胞中 K_{Ca}3.1 通道电流产生的效果。被细胞内 Ca²⁺ 和 1-EBIO 激活的 K_{Ca}3.1 电流是被 SF-2 以浓度依赖受到抑制。

[0106] K_{Ca}3.1 电流的大小是在未暴露于 SF-2 化合物中的细胞中是 37.49 $\pm$ 1.51 pA/pF, 在暴露于 SF-2 化合物 10、30、100、300、1000 nM 中的细胞中分别是 26.65 $\pm$ 1.89 mV/pF、11.69 $\pm$

1.66mV/pF、 7.12 ± 1.33 mV/pF、 1.87 ± 0.24 mV/pF、 1.95 ± 0.44 mV/pF,显示 $K_{Ca}3.1$ 电流显著减少。

[0107] 2-2)SF-3至SF-8化合物对 $K_{Ca}3.1$ 电流产生的效果

[0108] 附图2是显示SF-3至SF-8化合物对所述成纤维细胞中 $K_{Ca}3.1$ 通道电流产生的效果。被细胞内 Ca^{2+} 和1-EBIO激活的 $K_{Ca}3.1$ 电流是被SF-3至SF-8化合物以浓度依赖受到抑制。

[0109] 2-3)SF-3至SF-8化合物对炎症的抑制效果

[0110] 附图3是显示SF-2至SF-8化合物对所述成纤维细胞中被LPS诱发的炎症的抑制效果。通过LPS的炎症诱发效果是以炎症标志物的mRNA表达程度进行判定。将所述成纤维细胞在LPS(10ug/ml)中暴露24小时后,作为炎症标志物的IL6等的mRNA量增加。

[0111] 此外,将成纤维细胞与LPS一起在SF-2化合物至SF-8化合物之一中暴露24小时后,炎症标志物的mRNA表达程度减少。附图3中试验结果是以平均 $\pm$ SE标记,表示 $n=6 \sim 8$, $## < 0.01$ (正常对照组:疾病诱发组), $** < 0.01$ (疾病诱发组:给药组)。

[0112] 2-4)SF-3至SF-8化合物对纤维化的抑制效果

[0113] 附图4是显示SF-2至SF-8对成纤维细胞中被 TGF_{β} 诱发的纤维化的纤维化抑制效果。在此,通过 TGF_{β} 的纤维化诱发效果是以纤维化标志物的mRNA表达程度判定。将所述成纤维细胞在 TGF_{β} (10ng/ml)中暴露24小时后,作为纤维化标志物的 α -smooth muscle actin(α -平滑肌肌动蛋白, α -SMA)、collagen 1 α (I型胶原蛋白 α ,Coll1 α)、collagen 3 α (III型胶原蛋白 α ,Col3 α)mRNA量增加。

[0114] 此外,将成纤维细胞与 TGF_{β} 一起在SF-2至SF-8化合物之一中暴露24小时后,炎症标志物的mRNA表达程度减少。附图4中试验结果是以平均 $\pm$ SE标记,表示 $n=6 \sim 8$, $## < 0.01$ (正常对照组:疾病诱发组), $** < 0.01$ (疾病诱发组:给药组)。

[0115] 3)SF-2化合物对肺病小鼠模型的效果

[0116] 3-1)组织学或免疫组织化学分析结果

[0117] 用从所述小鼠模型中摘出的肺组织制作石蜡组织标本,实施了对纤维化标志物即胶原蛋白的免疫组织化学染色。附图5是显示所述肺组织的马松三色(Masson's trichrome)染色结果,疾病诱发组(BLM)与正常对照组(Sham control)相比显示纤维化程度增加,而在给药组(BLM+SF-2)中显示纤维化程度减少。

[0118] 因此可以确认,本发明的SF-2化合物对肺纤维化具有抑制的效果。附图5中“BLM”表示通过博来霉素1.5单位处理的疾病诱发组,“BLM+SF-2”是表示将SF-2化合物10mg/kg/day或者100mg/kg/day与博来霉素1.5单位一起给药的给药组。

[0119] 3-2)对纤维化标志物mRNA表达的分析结果

[0120] 为了确认所述小鼠模型中SF-2化合物对纤维化标志物即mRNA表达产生的影响,进行了对纤维化标志物即Coll1 α (I型胶原蛋白 α ,collagen 1 α)、Col3 α (III型胶原蛋白 α ,collagen 3 α)、 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白, α -smooth muscle actin)的RT-PCR(逆转录-聚合酶链反应)检测。

[0121] 如图6中所示,与正常对照组(C)相比,在疾病诱发组(BLM)的肺组织中Coll1 α 、Col3 α 、 α -SMA的mRNA表达水平大幅增加,显示发展成纤维化。但在给药组(BLM+SF-2)中,Coll1 α 、Col3 α 、 α -SMA的mRNA表达水平大幅减少,因此可以确认纤维化得到抑制。这些结果可以表明,本发明的SF-2化合物对肺纤维化具有抑制效果。图6中的试验结果是以平均 $\pm$ SE标记,

表示 $n=6$, $* < 0.05$, $** < 0.01$ 。

[0122] 4) 对肝病小鼠模型的实验结果

[0123] 4-1) 组织学或免疫组织化学分析

[0124] 附图7是显示对所述肝组织胶原蛋白纤维的马松三色染色法(Masson's trichrome)染色结果,正常对照组(Sham control)的肝组织是尚未进行纤维化的健康状态,与其相比,疾病诱发组(CDAHFD)的肝组织是被染色成蓝色,表明纤维化已在进行。但给所述疾病诱发组给药SF-2化合物的给药组(CDAHFD+SF-2)的肝组织中被染色成蓝色的程度大幅减少,进而观察到纤维化被大幅抑制。

[0125] 4-2) 对纤维化标志物mRNA表达的分析结果

[0126] 为了确认所述小鼠模型中SF-2化合物对纤维化标志物mRNA表达产生的影响,进行了对纤维化标志物即Col1 α (I型胶原蛋白 α , collagen 1 α)、Col3 α (III型胶原蛋白 α , collagen 3 α)、 α -SMA(α -平滑肌肌动蛋白, α -smooth muscle actin)的RT-PCR(逆转录-聚合酶链反应)检测。

[0127] 如图8中所示,与正常对照组(C)相比,在疾病诱发组(CDAHFD)的肺组织中Col1 α 、Col3 α 、 α -SMA的mRNA表达水平大幅增加,显示已进行纤维化。但在给药组(CDAHFD+SF-2)中,Col1 α 、Col3 α 、 α -SMA的mRNA表达水平大幅减少,因此可以确认纤维化得到抑制。

[0128] 这些结果可以表明,本发明的SF-2化合物对肺纤维化具有抑制效果。图8中的试验结果是以平均 $\pm$ SE标记,表示 $n=6$, $* < 0.05$, $** < 0.01$ 。

[0129] 5) 实验结果评估

[0130] 根据如上所述的实验结果可以确认,本发明的结构式2化合物即索里亚姆菲托对于被博来霉素诱发肺纤维化的小鼠模型和被CDAHFD饲料诱发肝纤维化的小鼠模型分别具有抑制效果。

[0131] 本发明的结构式2至8化合物已被确认,对于被LPS诱发炎症的成纤维细胞以及被TGF β 诱发纤维化的成纤维细胞,分别具有炎症和纤维化抑制效果。这些结果表明,本发明的结构式2至8化合物对于K_{Ca}3.1通道的表达具有抑制效果。

[0132] 另外,如前面背景技术中所述,K_{Ca}3.1通道除了炎症和纤维化疾病以外,对于自身免疫性疾病以及癌症的发展也发挥非常重要的作用。因此,全球各研究集团或者制药公司纷纷利用TRAM-34,塞尼卡泊(senicapoc)等K_{Ca}3.1通道抑制剂(inhibitor)投入自身免疫性疾病、炎症及纤维化疾病、癌症治疗药物的开发。

[0133] 如上所述,抑制K_{Ca}3.1通道,不仅可以抑制炎症和纤维化,还可以抑制自身免疫性疾病以及癌症的发展,因此可以充分表明,本发明的结构式2至8化合物对于自身免疫性疾病以及癌症治疗也具有效果。

[0134] 本发明中,由于受到实际情况的限制,对属于所述结构式1的所有化合物未能实施如上所述的实验,但鉴于化学活性和体内中的代谢机制,可以推测,所述结构式1化合物均具有与所述结构式2至8化合物相似的药理效果。

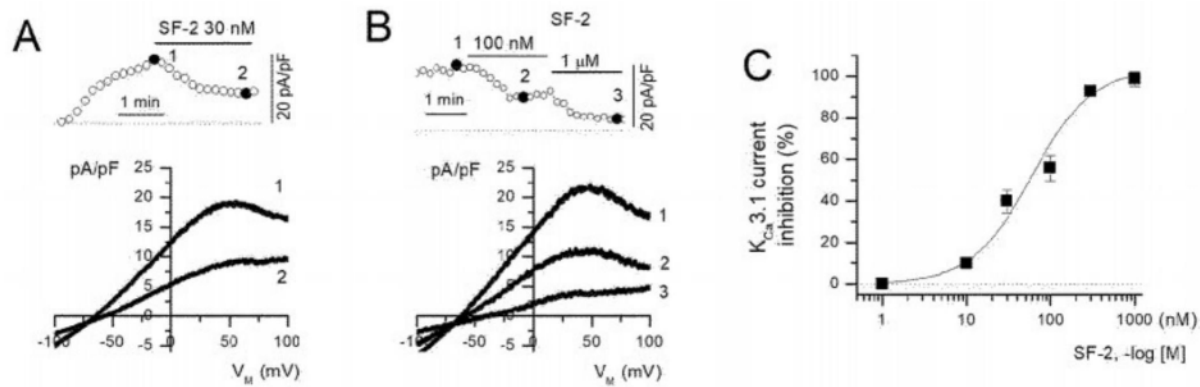


图1

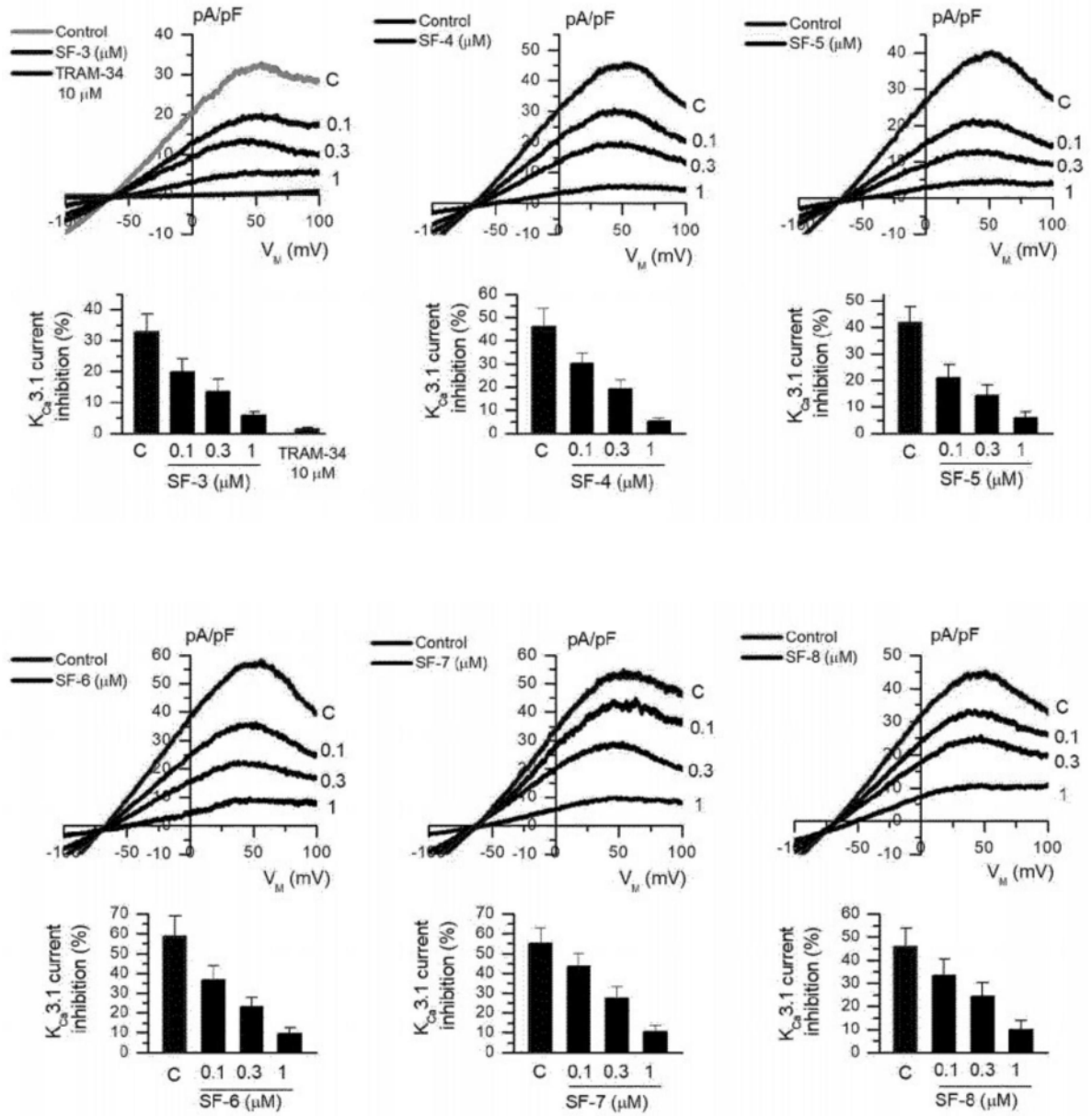


图2

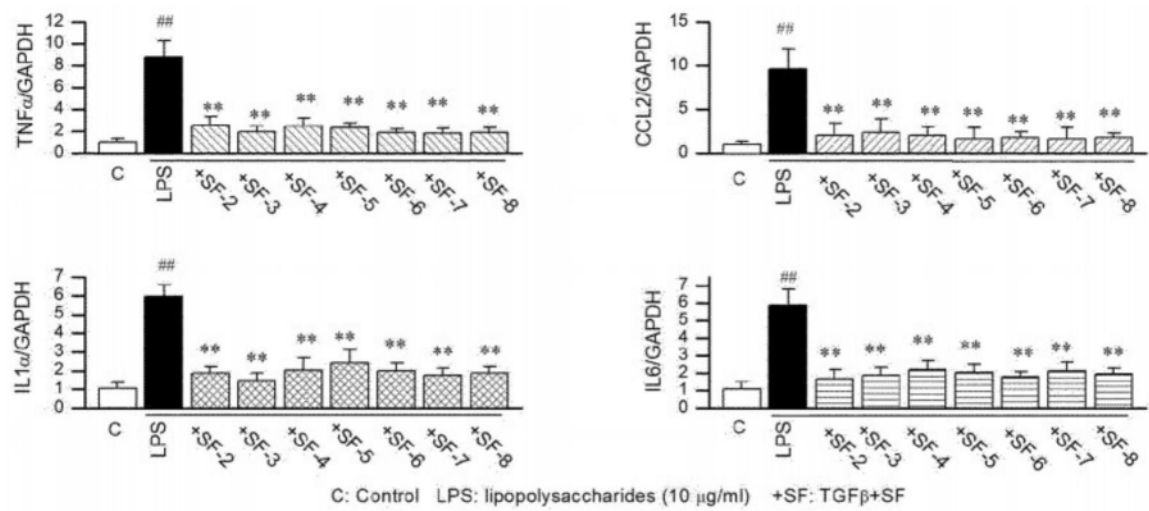


图3

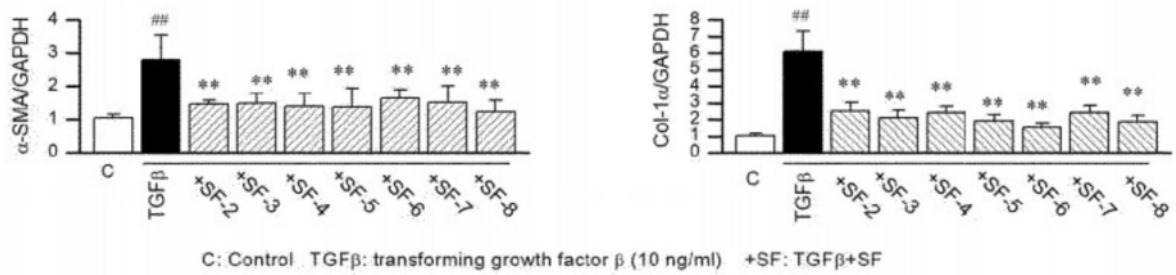


图4

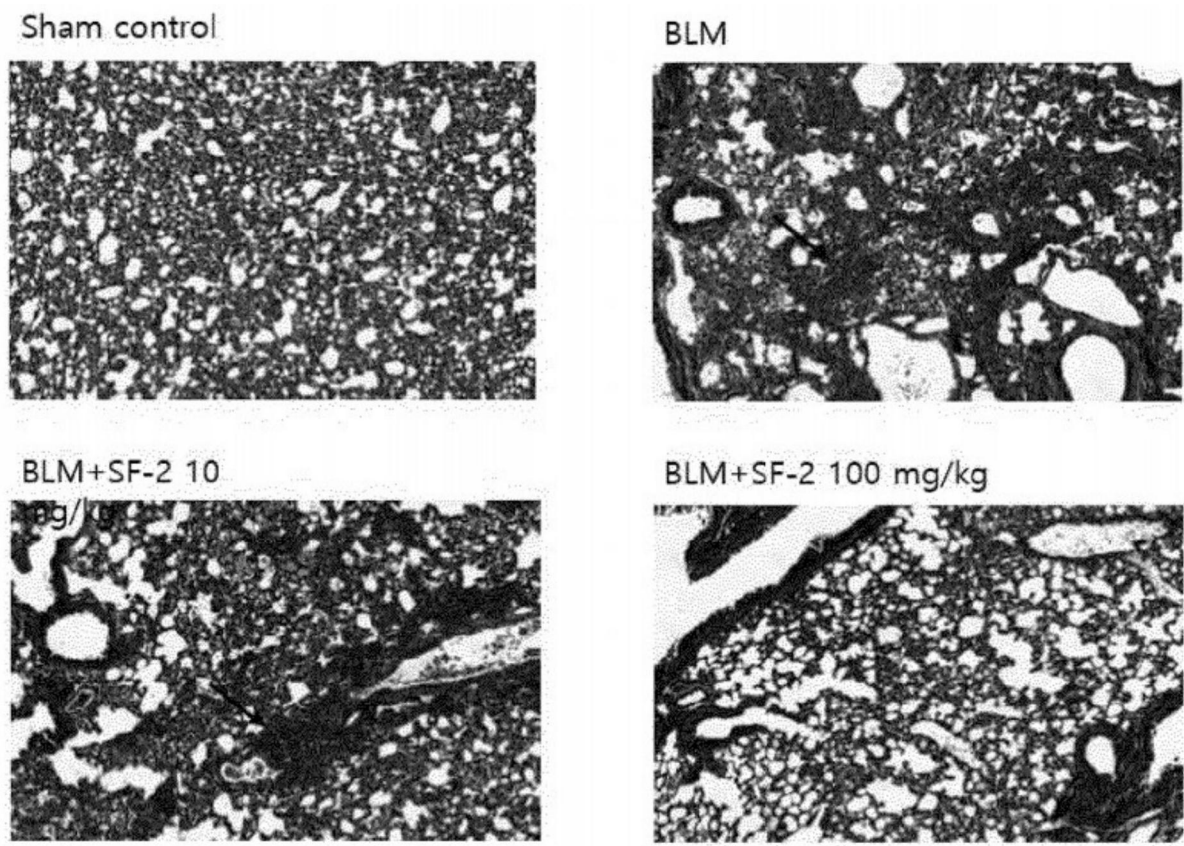


图5

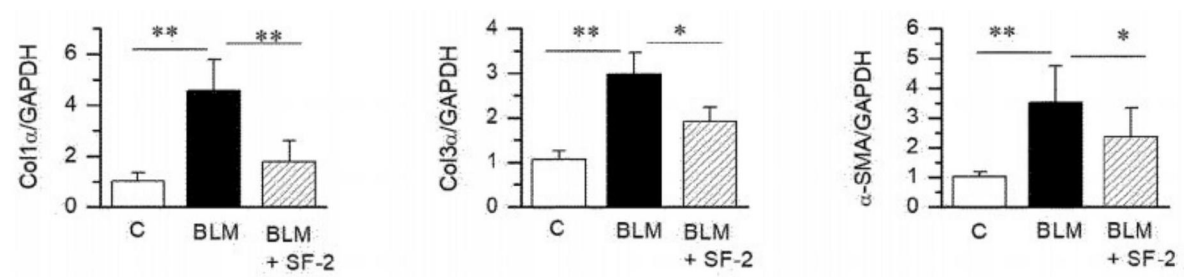


图6

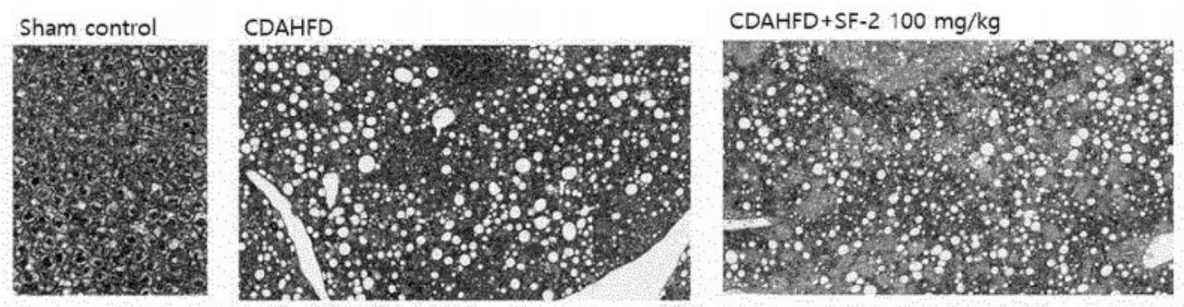


图7

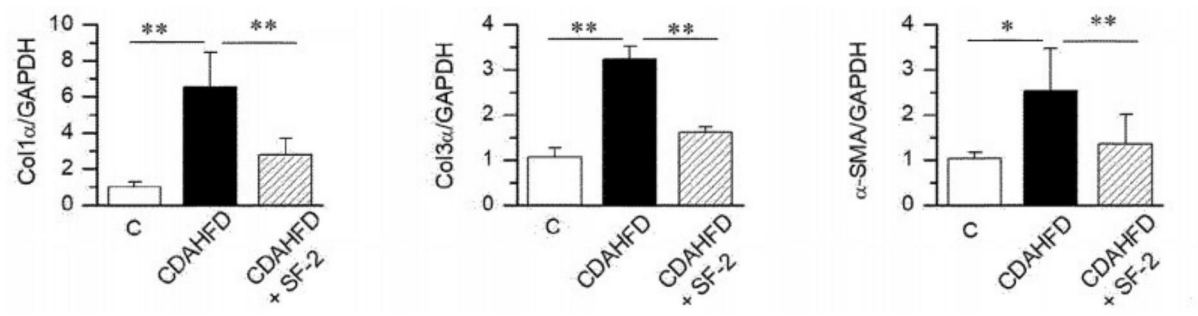


图8