



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107074839 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201480058587.X

卢特福·阿布-艾-海格 渡边湛

(22)申请日 2014.08.29

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(30)优先权数据

代理人 单骁越

14/013,918 2013.08.29 US

14/052,074 2013.10.11 US

14/270,130 2014.05.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.04.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/053334 2014.08.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/031710 EN 2015.03.05

(71)申请人 贝勒医学院

地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 上杉元成 萨利赫·J·瓦基尔

权利要求书5页 说明书58页

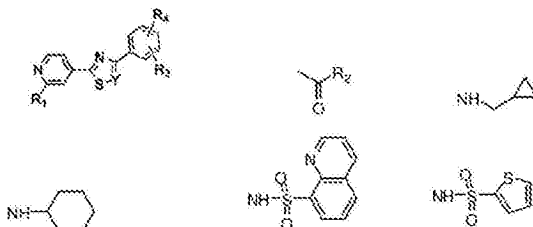
序列表11页 附图50页

(54)发明名称

用于治疗代谢和体重相关的病症的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及具有三联结构A-B-C的化合物、药物组合物和制剂,所述三联结构A-B-C具有嘧啶基、吡咯啉基或吡啶基A环,噻唑B环和苯基C环,它们可以进一步独立地被取代。还提供利用本文所述的化合物、药物组合物和制剂治疗代谢病症或细胞过度增生疾病的方法。还提供减轻体重或在体重减轻过程中增加生热作用的方法,所述方法利用如所述的结构A-B-C的化合物或这样的结构式的化合物,在所述结构式中R₁是H、Et、OMe或正丙基;Y是CH或(式);R₂是OH、OMe或NH-i-Pr;R₃是H、F或Cl;并且R₄是H、Me、Cl、Br、F、OH、OBz、OCH₂COOMe、OCH₂COOH、NH₂、NH-i-Pr、NHCOMe、NHSO₂Me、NHBn(式)、OMe、NHBoc(式)、NHTs(式)或(式);或其药用盐或立体异构体或二者。



1. 化合物, 其具有下述化学结构:

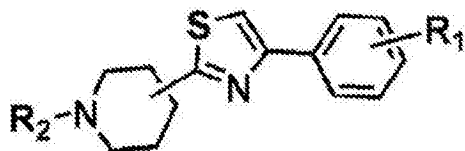
A-B-C

其中A是吡啶或取代的吡啶、哌啶或取代的哌啶、吡咯烷或取代的吡咯烷、噻唑或取代的噻唑、苯环或取代的苯环;

B是噻唑或取代的噻唑、哌嗪或取代的哌嗪、苯环或取代的苯环; 并且

C是苯环或取代的苯环、吡啶或取代的吡啶、噻唑或取代的噻唑。

2. 权利要求1的化合物, 其中所述化学结构是:



其中R₁是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷基氧基、-OC(O)R₃;

R₃是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₄;

R₄是H或C₁₋₃烷基、-NHR₅;

R₅是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₆氨基甲酸酯;

R₆是叔丁基或苄基甲基或-NH-SO₂-R₇磺酰胺;

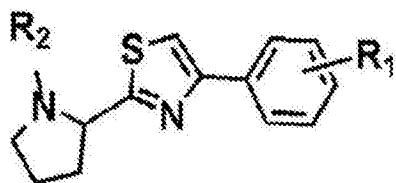
R₇是烷基或芳基,

R₂是烷基或R₈OC(O)-, 并且

R₈是C₃₋₅烷基或芳基。

3. 权利要求2的化合物, 其中所述卤素是溴。

4. 权利要求1的化合物, 其中所述化学结构是:



其中R₁是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷基氧基、-OC(O)R₃;

R₃是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₄;

R₄是H或C₁₋₃烷基、-NHR₅;

R₅是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₆氨基甲酸酯;

R₆是叔丁基或苄基甲基或-NH-SO₂-R₇磺酰胺;

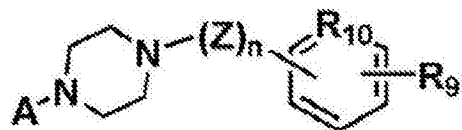
R₇是烷基或芳基,

R₂是烷基或R₈OC(O)-, 并且

R₈是C₃₋₅烷基或芳基。

5. 权利要求4的化合物, 其中所述卤素是溴。

6. 权利要求1的化合物, 其中所述化学结构是:



其中R₉是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷基氧基、-OC(O)R₁₁;

R₁₁是C₁-C₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₁₂;

R₁₂是H或C₁-C₃烷基、-NHR₁₃;

R₁₃是H、C₁-C₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₁₄氨基甲酸酯;

R₁₄是叔丁基或苄基甲基、-NH-SO₂-R₁₅磺酰胺;

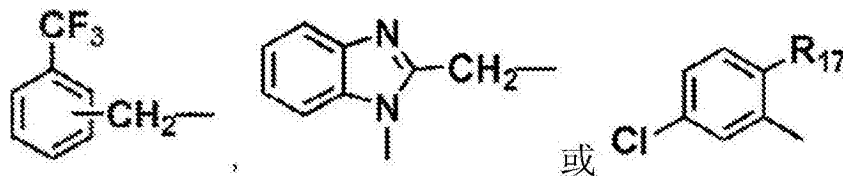
R₁₅是烷基或芳基或-SO₂-NH-R₁₆磺酰胺;

R₁₆是烷基或芳基,

R₁₀是氮或亚甲基,

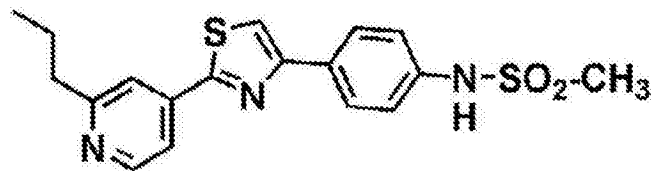
n是0或1,并且当n为1时,Z是-C=O;并且

A是

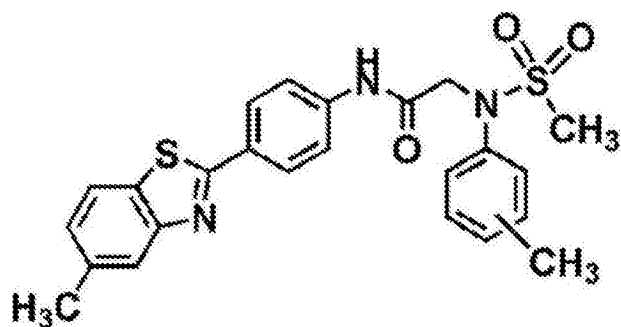


其中R₁₇是H或C₁-C₃烷基。

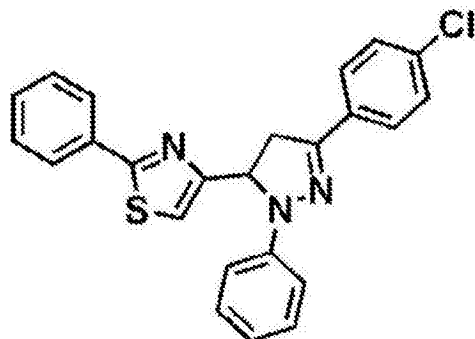
7. 权利要求1的化合物,其中所述化学结构是:



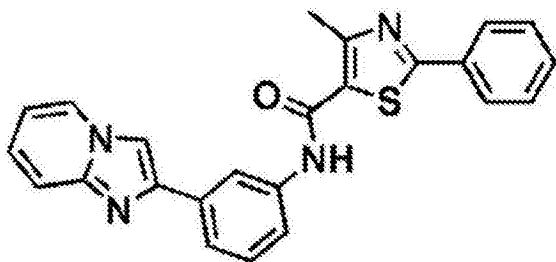
8. 权利要求1的化合物,其中所述化学结构是:



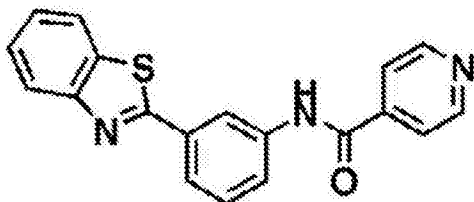
9. 权利要求1的化合物,其中所述化学结构是:



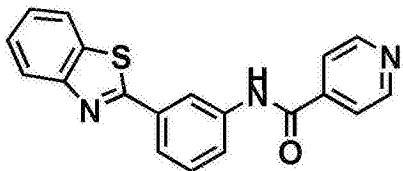
10. 权利要求1的化合物,其中所述化学结构是:



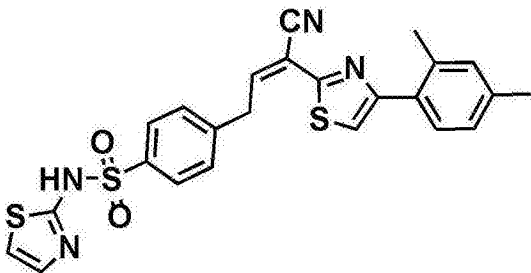
11. 权利要求1的化合物,其中所述化学结构是:



12. 权利要求1的化合物,其中所述化学结构是:



13. 权利要求1的化合物,其中所述化学结构是:



14. 治疗动物中的代谢病症的方法,所述方法包括下述步骤:

向所述动物施用治疗有效量的至少一种权利要求1的化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合。

15. 权利要求14的方法,其还包括下述步骤:

向所述动物提供第二疗法。

16. 权利要求15的方法,其中所述第二疗法包括饮食疗法、物理疗法、行为疗法、手术、药物疗法或其组合。

17. 权利要求16的方法,其中所述第二疗法是生活方式改变、抗高血糖剂、胰岛素、胰高血糖素样肽 (GLP)、二肽基肽酶-4抑制剂、噻唑烷二酮、降脂化合物或它们中两种以上的组合。

18. 权利要求14的方法,其中所述代谢病症是与细胞过度增生相关的疾病、体重相关的病况、高脂血症、糖尿病或其并发症、脂肪肝、高血压或心血管病。

19. 权利要求18的方法,其中所述代谢病症是肥胖、高血压、动脉硬化、哮喘、高脂血症、高胰岛素血症、非酒精性脂肪肝和由胰岛素抵抗导致的2型糖尿病。

20. 权利要求18的方法,其中所述与细胞过度增生相关的疾病是癌症。

21. 权利要求20的方法,其中所述癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、前列腺癌、消化道癌、尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、淋巴瘤、肉瘤、黑色素瘤、白血病或实体瘤的远处转移。

22. 权利要求18的方法,其中所述代谢病症是体重相关的病症,所述治疗有效量的所述化合物增加解偶联蛋白1、解偶联蛋白2或解偶联的蛋白3的表达。

23. 权利要求18的方法,其中所述代谢病症是体重相关的病症,在动物体重减轻过程中,所述治疗有效量的所述化合物增加生热作用,而不减少瘦体重。

24. 用于治疗有此需要的患者中的细胞过度增生疾病的方法,所述方法包括下述步骤:
向所述患者施用治疗有效量的至少一种权利要求1的化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合。

25. 权利要求24的方法,其中所述细胞过度增生疾病是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、前列腺癌、消化道癌、尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、淋巴瘤、肉瘤、黑色素瘤、白血病或实体瘤的远处转移。

26. 用于减轻有此需要的动物的体重的方法,所述方法包括下述步骤:向所述动物施用
在药用介质中的治疗有效量的一种或多种权利要求1的化合物。

27. 权利要求26的方法,其中所述动物患有肥胖、高血压、动脉硬化、哮喘、高脂血症、高胰岛素血症、非酒精性脂肪肝或由胰岛素抵抗导致的2型糖尿病或其组合。

28. 制剂,所述制剂包含权利要求1的化合物和食品、动物饲料物质或药物。

29. 用于在动物体重减轻过程中增加生热作用而不减少瘦体重的方法,所述方法包括
下述步骤:向所述动物施用治疗有效量的权利要求28的制剂。

30. 药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1的化合物和药用赋形剂。

31. 用于治疗有此需要的患者中的癌症的方法,所述方法包括下述步骤:向所述患者施用
治疗有效量的一种或多种权利要求30的药物组合物。

32. 试剂盒,其包含:

权利要求1的化合物,和
容纳所述化合物的容器。

33. 化合物,其为:

2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯,

2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯,

4-(4-溴苯基)-2-(吡咯烷-2-基)噻唑,

4-(4-溴苯基)-2-(1-丙基吡咯烷-2-基)噻唑,

3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯,

3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,

3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)-1-丙基哌啶,

4-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,

(R)-2-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯

3-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯

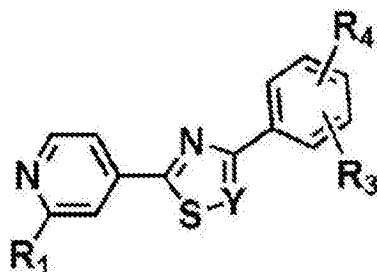
4-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯

4-(3-(吡啶-2-基)-[1,2,4]三唑并[4,3-b]哒嗪-6-基)-N-甲基磺酰基苯胺,

(4-(5-氯-2-甲基苯基)哌嗪-1-基)(4-甲磺酰基氨基)苯基)甲酮,
 4-(4-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)-N-甲磺酰基苯胺,
 3-氯-4-甲基-N-(6-(4-(3-(三氟甲基)苄基)哌嗪-1-基)吡啶-3-基)苯磺酰胺
 4-氯-N-(4-(4-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)苯基)苯磺酰胺
 (Z)-4-(3-氰基-3-(4-(2,4-二甲基苯基)噻唑-2-基)烯丙基)-N-(噻唑-2-基)苯磺酰胺

N-(3-(H-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)苯基)-4-甲基-2-苯基噻唑-5-甲酰胺,
 N-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)苯基)异烟酰胺,
 3-(4-氯苯基)-4,5-二氢-1-苯基-5-(2-苯基噻唑-4-基)-1H-吡唑,
 N-(4-(6-甲基苯并[d]噻唑-2-基)苯基)-2-(N-间甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺;或
 N-(4-(6-甲基苯并[d]噻唑-2-基)苯基)-2-(N-对甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺。

34. 用于在动物体重减轻过程中增加生热作用而不减少瘦体重的方法,所述方法包括向所述动物施用在药用介质中的治疗有效量的化合物的步骤,所述化合物具有下述结构:



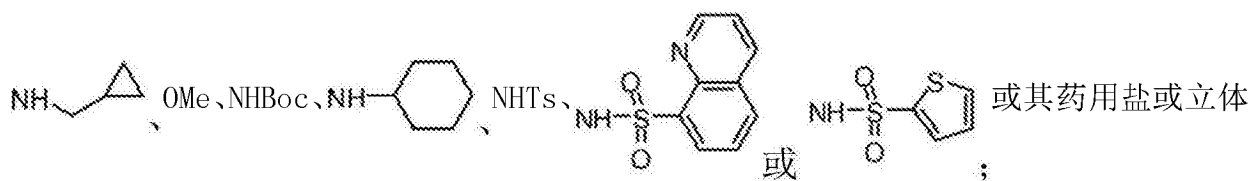
其中R₁是H、Et、OMe或正丙基;

Y是CH或 ;

R₂是OH、OMe或NH-i-Pr;

R₃是H、F或Cl;并且

R₄是H、Me、Cl、Br、F、OH、OBz、OCH₂COOMe、OCH₂COOH、NH₂、NH-i-Pr、NHCOMe、NHSO₂Me、NHBn、



异构体或它们的组合。

35. 权利要求34的方法,其中所述动物患有下述体重相关的病况:肥胖、高血压、动脉硬化、哮喘、高脂血症、高胰岛素血症、非酒精性脂肪肝和由胰岛素抵抗导致的2型糖尿病。

37. 权利要求36的方法,其还包括向所述动物提供第二疗法,所述第二疗法包括生活方式改变、抗高血糖剂、胰岛素、胰高血糖素样肽(GLP)、二肽基肽酶-4抑制剂、噻唑烷二酮、降脂化合物或它们中两种以上的组合。

38. 权利要求1的方法,其中所述化合物被配制为食品、动物饲料材料或药物。

39. 权利要求38的方法,其中所述化合物增加解偶联蛋白1、解偶联蛋白2和解偶联蛋白3的表达。

用于治疗代谢和体重相关的病症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本国际申请依据35U.S.C. §120要求于2014年5月5日提交的待审的申请美国序号14/270,130的优先权的利益,其依据35U.S.C. §120要求于2013年10月11日提交的待审的申请美国序号14/052,074的优先权的利益,其依据35U.S.C. §120要求于2013年8月29日提交的待审的申请美国序号14/013,918的优先权的利益,所有这些申请通过引用完全结合在本文中。

[0003] 联邦基金说明

[0004] 本发明使用了来自国立卫生研究院(National Institutes of Health)资助金GM-63115和国防部资助金号DAMD 17-03-1-0228的联邦基金。美国政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

发明领域

[0006] 概括来说,本发明涉及代谢病症的医药和分子生物学领域。在具体的方面中,本发明的领域涉及用于治疗病症如部分由于生热作用的上调所致的肥胖的特定组合物。在某些方面中,所述组合物包含法图他汀A(fatostatin A)及其类似物或衍生物。

[0007] 相关领域的描述

[0008] 代谢综合征涉及许多心血管危险因子,包括高血压(hypertension)、异常脂血症(dyslipidaemia)、肥胖(obesity)、2型糖尿病(type 2 diabetes)、胰β细胞功能障碍(pancreatic β-cell dysfunction)和动脉粥样硬化(atherosclerosis)。脂肪或碳水化合物含量不同的饮食有利于动物(包括人)的能量代谢。长链脂肪酸是主要的能量来源和构成细胞膜的脂质的重要成分。它们来源于食物,并且由乙酰辅酶A从头合成。胆甾醇也来源于食物并且由乙酰辅酶A合成。碳水化合物通过脂肪酸和胆甾醇的从头合成转化为酰基甘油酯分别涉及至少12种和23种酶反应。编码这些酶的基因的表达水平受到被称为甾醇调节元件结合蛋白(SREBP)的三种转录因子SREBP-1a、-1c和SREBP-2的控制。这些膜结合蛋白是转录因子的基本螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链家族的一类的成员。和其他亮氨酸拉链成员的转录因子不同,SREBP被合成为ER-膜结合前体,该前体需要由两种结合高尔基体膜的蛋白酶(位点-1和位点-2蛋白酶)通过蛋白水解释放,以激活细胞核中的靶基因的转录。

[0009] SREBP的蛋白水解激活受到甾醇的紧密调控,所述调控是通过与SREBP切割激活蛋白(SCAP)(SREBP的ER-膜结合护卫蛋白)的相互作用。当甾醇在ER膜中蓄积时,SCAP/SREBP复合物不能离开ER到达高尔基体,并且因此SREBP的蛋白水解加工受到抑制。SREBP是控制脂肪代谢体内稳态的关键脂肪生成转录因子。

[0010] 现有技术缺少可用于治疗多种代谢病症的新型组合物和方法。本发明满足了本领域中的这一长期存在的需求和愿望。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明教导用于治疗代谢病症的化合物、其制剂和药物组合物及其应用,所述代

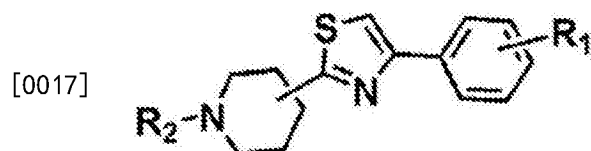
谢病症诸如,但不限于,涉及细胞过度增生的疾病(例如,癌症)或体重相关的病况。

[0013] 本发明涉及具有下述一般结构的化合物:

[0014] A-B-C

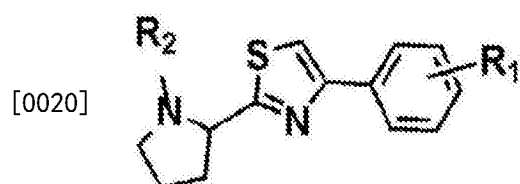
[0015] A环是吡啶或取代的吡啶、哌啶或取代的哌啶、吡咯烷或取代的吡咯烷、噻唑或取代的噻唑、苯环或取代的苯环。B环是噻唑或取代的噻唑、哌嗪或取代的哌嗪、苯环或取代的苯环。C环是苯环或取代的苯环、吡啶或取代的吡啶,噻唑或取代的噻唑。

[0016] 本发明还涉及具有下述化学结构的化合物:



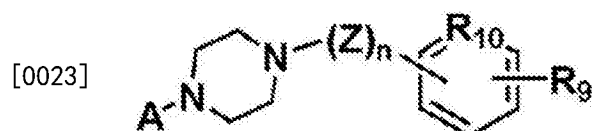
[0018] R₁取代基是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷氧基、-OC(O)R₃;R₃是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₄;R₄是H或C₁₋₃烷基、-NHR₅;R₅是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₆氨基甲酸酯;R₆是叔丁基或苄基、-NH-SO₂-R₇磺酰胺,并且R₇是烷基或芳基。R₂取代基可以是烷基或R₈OC(O)-,并且R₈是C₃₋₅烷基或芳基。

[0019] 本发明进一步涉及具有下述化学结构的化合物:

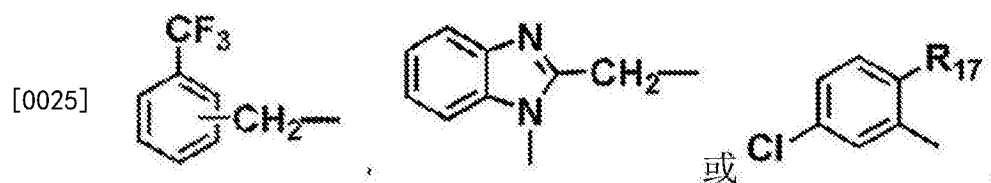


[0021] R₁取代基是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷氧基、-OC(O)R₃;R₃是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₄;R₄是H或C₁₋₃烷基、-NHR₅;R₅是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₆氨基甲酸酯;R₆是叔丁基或苄基、-NH-SO₂-R₇磺酰胺,并且R₇是烷基或芳基。R₂取代基可以是烷基或R₈OC(O)-,并且R₈是C₃₋₅烷基或芳基。

[0022] 本发明进一步涉及具有下述化学结构的化合物:



[0024] R₉是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷氧基、-OC(O)R₁₁;R₁₁是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₁₂;R₁₂是H或C₁₋₃烷基、-NHR₁₃;R₁₃是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₁₄氨基甲酸酯;R₁₄是叔丁基或苄基、-NH-SO₂-R₁₅磺酰胺;R₁₅是烷基或芳基或-SO₂-NH-R₁₆磺酰胺,并且R₁₆是烷基或芳基。R₁₀是氮或亚甲基。n是0或1,并且当n为1时,Z是-C=O。A可以具有下述结构:



其中R₁₇是H或C₁₋₃烷基。

[0026] 本发明涉及本文所述的化合物,其被配制成在药用赋形剂中的药物组合物,或者

被配制成包含食物、动物饲料物质或药物的制剂。本发明还涉及试剂盒,所述试剂盒包含本文所述的化合物或其组合或其药物组合物或其他制剂以及容纳所述化合物的容器。

[0027] 本发明进一步涉及下述的化合物:N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)甲烷磺酰胺,2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯,2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯,4-(4-溴苯基)-2-(吡咯烷-2-基)噻唑,4-(4-溴苯基)-2-(1-丙基吡咯烷-2-基)噻唑,3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯,3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)-1-丙基哌啶,4-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,(R)-2-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯,3-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,4-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,4-(3-(吡啶-2-基)-[1,2,4]三唑并[4,3-b]哒嗪-6-基)-N-甲苯磺酰基苯胺,(4-(5-氯-2-甲基苯基)哌嗪-1-基)(4-(甲苯磺酰基氨基)苯基)甲酮,4-(4-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)-N-甲苯磺酰基苯胺,3-氯-4-甲基-N-(6-(4-(3-(三氟甲基)苄基)哌嗪-1-基)吡啶-3-基)苯磺酰胺,4-氯-N-(4-(4-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)苯基)苯磺酰胺,(Z)-4-(3-氰基-3-(4-(2,4-二甲基苯基)噻唑-2-基)烯丙基)-N-(噻唑-2-基)苯磺酰胺,N-(3-(H-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)苯基)-4-甲基-2-苯基噻唑-5-甲酰胺,N-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)苯基)异烟酰胺,3-(4-氯苯基)-4,5-二氢-1-苯基-5-(2-苯基噻唑-4-基)-1H-吡唑,N-(4-(6-甲基苯并[d]噻唑-2-基)苯基)-2-(N-间甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺,N-(4-(6-甲基苯并[d]噻唑-2-基)苯基)-2-(N-对甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺;其药用盐;立体异构体;及其任意组合。

[0028] 本发明进一步涉及用于治疗动物中的代谢病症的方法,所述方法包括给个体施用治疗有效量的至少一种具有化学结构A-B-C的或如本文具体所述的化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合的步骤。在优选的方面中,所述代谢病症是癌症或体重相关的病症。本发明涉及进一步包括提供第二疗法的步骤的相关方法。所述第二疗法包括饮食疗法、物理疗法、行为疗法、手术、药物疗法和它们的组合。在一些方面中,所述代谢病症是糖尿病,并且另外的疗法包括饮食疗法、物理疗法和药物疗法。

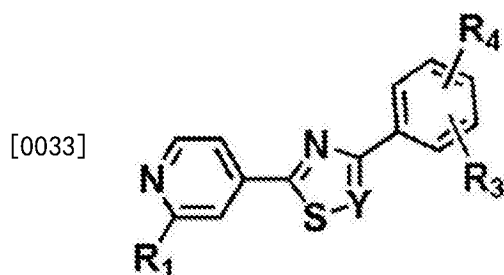
[0029] 本发明进一步涉及用于治疗有此需要的患者中的细胞过度增生疾病的方法。所述方法包括给所述患者施用治疗有效量的至少一种本文所述的化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合的步骤。

[0030] 本发明进一步涉及用于减轻有此需要的动物的体重的相关方法。所述方法包括向患者施用治疗有效量的至少一种本文所述的化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合。

[0031] 本发明进一步涉及用于减轻有此需要的动物的体重的方法。所述方法包括向所述动物施用在药用介质中的治疗有效量的具有结构A-B-C的或如本文具体所述的化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合。A环可以是吡啶或取代的吡啶、哌啶或取代的哌啶、吡咯烷或取代的吡咯烷、噻唑或取代的噻唑、苯环或取代的苯环。B环可以是噻唑或取代的噻唑、哌嗪或取代的哌嗪、苯环或取代的苯环。C环可以是苯环或取代的苯环、吡啶或取代的吡啶、噻唑或取代的噻唑。

[0032] 本发明还涉及用于在动物体重减轻过程中增加生热作用而不减少瘦体重的方法,

所述方法包括以下步骤：向所述动物施用在药用介质中的治疗有效量的具有下述结构的化合物：



[0034] 或其药用盐或立体异构体或它们的组合。 R_1 取代基可以是H、Et、OMe或正丙基；Y是CH

或 R_2 取代基可以是OH、OMe或NH-i-Pr。 R_3 取代基可以是H、F或Cl。 R_4 取代基是H、Me、

Cl、Br、F、OH、OBz、OCH₂COOMe、OCH₂COOH、NH₂、NH-i-Pr、NHCOMe、NHSO₂Me、NHBn、NH-

OMe、NHBoc、NH-、NHTs、或 所述化合物可以是其药用盐

或立体异构体或它们的组合。

[0035] 前文已经相当宽泛地描述了本发明的特征和技术优点，从而可以更好地理解以下本发明的详细描述。本发明的其他特征和优点将在下文中描述，这构成本发明权利要求的主题。本领域技术人员应理解，所公开的概念和具体实施方案可容易地用作改进或设计用于实施本发明相同目的的其他结构的基础。本领域技术人员还应理解，这些等价构造并不背离所附权利要求书所提出的本发明的精神和范围。结合附图考虑时，通过以下描述将更好地理解本发明的组织结构和操作方法中本发明特征性的新特征，以及其他目的和优点。然而应清楚地理解，每幅附图仅仅是阐述和说明的目的，不应定义为本发明的限制。

[0036] 附图简述

[0037] 为了更全面地理解本发明，现在将结合附图进行以下描述。

[0038] 图1A-1B显示了通过RT-PCR的微阵列结果的验证。将DU145细胞用DMSO(泳道1)和5 μ M法图他汀A(泳道2)处理6小时(图1A)。然后提取总RNA并进行RT-PCR。(图1B) RT-PCR和微阵列数据的总结。ACL, ATP柠檬酸裂解酶；HMG CoAR, 3-羟基-3-甲基-戊二酰-辅酶A还原酶；LDLR, 低密度脂蛋白受体，MVD, 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶；SCD, 硬脂酰-辅酶A去饱和酶；INSIG1, 胰岛素诱导基因1；GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

[0039] 图2A-2C显示法图他汀A抑制内源性SREBP激活报道基因的能力。用SRE-1-驱动的荧光素酶报道子(pSRE-Luc)(图2A)和肌动蛋白启动子控制下的 β -gal报道子(图2B)共转染HEK293细胞。在包含无脂质血清的培养基中用各种浓度的法图他汀A或仅用DMSO处理转染的细胞。培育20小时后，测定荧光素酶活性，数据通过 β -半乳糖苷酶活性标准化。在图2C中，用pCMV-SREBP-1c(1-436)和pSRE-Luc转染HEK293细胞，在包含无脂质血清的培养基中用或不用20mM法图他汀A处理转染的细胞。每个值代表三次独立实验的平均值。

[0040] 图3A-3H显示了法图他汀A对SREBP-1和-2的作用。将DU145细胞用单独的DMSO或法

图他汀A (1和5 μ M) 处理6小时。通过蛋白质印迹检查SREBP-1 (图3A) 或SREBP-2 (图3B) 的前体和成熟形式的水平。下侧的图显示肌动蛋白的蛋白质印迹, 作为上样对照。(图3C-3H) 通过免疫染色检验SREBP-1的定位。细胞用单独的DMSO (图3C-3E) 或5 μ M法图他汀A (图3F-3H) 处理, 然后用DAPI染色 (图3C和图3F) 或用抗-SREBP-1染色 (图3D和图3G)。

[0041] 图4A-4G显示了通过siRNA敲低SREBP-1来抑制胰岛素诱导的脂肪生成。建立两个SREBP-1的表达被敲低的3T3-L1细胞的稳定转染的克隆, 并诱导其分化形成脂肪细胞。敲低的细胞不分化 (图4D和图4F), 而用空白载体 (neo) 转染的3T3-L1细胞大部分分化形成脂肪细胞 (图4B)。图4A、4C和4E显示不进行胰岛素诱导的细胞。图4G是克隆的蛋白质印迹分析, 表明成功敲低了SREBP-1。

[0042] 图5A-5B证明了siRNA敲低SREBP-1阻断DU145前列腺癌细胞的血清不依赖性生长。在图5A中, 建立两个SREBP-1表达被敲低的DU145细胞的稳定转染的克隆, 并在不含血清、含2%胎牛血清 (FBS)、2%无脂肪胎牛血清或1 μ g/mL IGF1的MEM培养基中培育3天。通过WST-1测定测量生长速率。敲低的细胞在不含血清、含2%无脂肪FB或1 μ g/mL IGF1的MEM培养基中不生长, 但在血清存在下表现出与对照细胞一样多的生长。实验以一式三份进行。图5B是显示克隆1和2中SREBP-1敲低的程度的蛋白质印迹。

[0043] 图6A-6G证明了在禁食/重新给予无脂肪饮食后法图他汀A对小鼠的作用。在整个实验期间 (开始一天后禁食48小时然后再喂饲无脂肪饮食达48小时), 每天给小鼠腹膜内注射30mg/kg法图他汀A。在48小时喂饲结束时测量体重减轻 (图6A) 和食物摄取 (图6B)。图6C显示处理和对照小鼠的血清组成成分。图6D是代表性的来自对照和法图他汀A处理组的2只不同小鼠的肝脏提取物的SREBP-1的蛋白质印迹。将蛋白质的上样量标准化。图6E是显示肝脏提取物的FAS表达 (上图) 和上样对照的考马斯染色凝胶 (下图) 的代表性的蛋白质印迹。图6F-6G显示肝脏提取物中的FAS和ACC活性。数据为平均值+SD (n=5); *P<0.05。

[0044] 图7A-7E显示法图他汀A处理两周对小鼠的作用。将5-6月龄的小鼠每天注射30mg/kg法图他汀A或10%DMSO, 持续两周。图7A显示用法图他汀A处理前后的体重, 图7B显示处理后体重减轻的量。图7C显示处理和对照小鼠中葡萄糖、胆甾醇和甘油三酯 (TG) 的血清水平。图7D显示肝脏提取物中的FAS活性。图7E是对照组和处理组各三只小鼠的肝脏提取物的代表性的蛋白质印迹分析。蛋白质的上样量被标准化。数据表示为平均值+SD (n=5); *P<0.05。

[0045] 图8A-8C显示了法图他汀A对体重和食物消耗的影响。将两组ob/ob雄性小鼠 (n=5) 每天腹膜内注射法图他汀A或在PBS中的10%DMSO (对照组), 持续四周。小鼠用正常饲料饲养, 在实验第一天以及随后的每一天, 测量小鼠重量和消耗的食物量。图8A是代表性的对照和法图他汀A处理的小鼠的照片。图8B显示每天测定的各组内每只小鼠的重量。显示了重量的平均值和方差。在图8C中, 每天测量食物摄取, 并且表示为28天期间内每只小鼠的累积食物摄取。

[0046] 图9A-9H证明了对照和法图他汀A处理的ob/ob小鼠的血清组成成分。从禁食过夜的小鼠尾静脉采集血液, 分离细胞后收集血清。如下文所述测定组成成分。数据表示为平均值 $\pm$ SD, 每组n=5只小鼠。

[0047] 图10A-10D显示了法图他汀对ob/ob小鼠的肝脏和脂肪组织的影响。图10A显示法图他汀A处理的小鼠 (左) 和对照 (右) 的肝脏。图10B显示用Oil-Red O染色以检测脂滴并用

Mayer的苏木精复染的对照和法图他汀A ob/ob小鼠的肝脏的冷冻切片的组织学分析。用法图他汀A处理的三只不同小鼠的肝脏表现出染成红色的脂滴显著减少(上图),与处理的小鼠相比,对照显示富含染成红色的脂滴(下图)。图10C显示从法图他汀A处理的ob/ob小鼠(左)和对照(右)分离的附睾脂肪垫。图10D显示从ob/ob对照和法图他汀A处理的小鼠分离的肝脏和附睾脂肪垫的平均重量。数据表示为平均值 $\pm$ SD,每组n=5只小鼠(* P <0.05)。

[0048] 图11A-11B显示对照和法图他汀A处理的ob/ob小鼠的肝脏中的甘油三酯(图11A)和胆甾醇(图11B)水平。从肝脏提取脂质,如下文所述定量甘油三酯和胆甾醇。数据表示为平均值 $\pm$ SD,每组n=5只小鼠(* P =0.0004;† P =0.03)。

[0049] 图12A-12D证明了法图他汀A减少脂肪生成酶的表达水平和活性。图12A显示如下文所述在ob/ob小鼠的肝脏提取物中测定的乙酰辅酶A羧化酶(ACC)的活性,图12B显示脂肪酸合酶的活性。图12C是通过4-12%NuPAGE MES凝胶分离,用不同抗体探测,并用ECL检测的来自三只个体ob/ob小鼠的肝脏粗提物的蛋白质印迹分析。图12D显示对肌动蛋白标准化后,法图他汀A相对于对照小鼠的不同脂肪生成酶的特定条带的强度的比率。数据表示为平均值 $\pm$ SD,每组n=5只小鼠(† P =0.005;‡ P =0.002;* P <0.05)。

[0050] 图13显示了相对于法图他汀A ob/ob小鼠,在对照中肝脂肪生成酶的转录水平。每种基因的mRNA水平针对肌动蛋白进行标准化。从对照和法图他汀A处理的小鼠(n=5)分离RNA,并且通过实时定量RT-PCR测量。相对于对照,* P <0.05。

[0051] 图14A-14F显示了本发明示例性的化合物1-66。

[0052] 图15显示了利用示例性类似物2-18的标准荧光素酶报道基因测定。

[0053] 图16显示了利用示例性类似物19-34的标准荧光素酶报道基因测定。

[0054] 图17提供了利用示例性类似物35-44的标准荧光素酶报道基因测定。

[0055] 图18A-18D显示了法图他汀阻断SREBP的活化。在包含无脂质血清的培养基中通过法图他汀抑制内源性SREBP激活荧光素酶报道基因的能力。将CHO-K1细胞转染以SRE-1驱动的荧光素酶报道子(pSRE-Luc)(图18A)。将转染的细胞用在包含无脂质血清的培养基中的不同浓度的法图他汀处理。在包含无脂质血清的培养基中法图他汀对共转染以pCMV-SREBP-1c(1-436)和pSRE-Luc的CHO-K1细胞的影响(图18B)。在转染的CHO-K1细胞中的PLAP-BP2保持膜结合,除非其在高尔基体中被S1P裂解并且分泌到培养基中(左图)。与EtOH对照相比,用法图他汀(20 μ M)或甾醇(10 μ g/mL胆甾醇和1 μ g/mL 25-羟基胆甾醇)处理影响PLAP-BP2的裂解(图18C)。用法图他汀处理的CHO-K1细胞的蛋白质印迹分析。P和N分别表示SREBP-2未裂解的膜前体和裂解的细胞核形式(图18D)。

[0056] 图19A-19B显示法图他汀阻断SREBP从ER移位到高尔基体。图19A是蛋白质印迹分析,其显示布雷菲德菌素A(brefeldin A)对仅用EtOH、甾醇(10 μ g/mL胆甾醇和1 μ g/mL 25-羟基胆甾醇)或20 μ M法图他汀处理的CHO-K1细胞的影响。图19B是在有或没有20 μ M法图他汀或甾醇(10 μ g/mL胆甾醇和1 μ g/mL 25-羟基胆甾醇)存在下生长的细胞的利用抗-SCAP IgG-9D5的蛋白质印迹分析。右侧数字表示蛋白酶保护的SCAP片段上存在的N-连接的糖链数目。

[0057] 图20A-20D显示了丹酰法图他汀(dansyl fatostatin)、法图他汀-聚脯氨酸接头-生物素缀合物和聚脯氨酸接头-生物素缀合物的结构和使用它们处理的细胞。图20A显示怎样插入聚脯氨酸接头以更好地保护法图他汀分子(Sato等人,2007)。在图20B中,用丹酰法图他汀和ER-tracker red处理的CHO-K1细胞显示丹酰法图他汀定位在ER中。比例尺=10 μ

m.图20C显示法图他汀与SCAP的相互作用,这通过在CHO-K1膜提取物中,用结合于用生物素化的法图他汀饱和的中性链亲和素 (Neutravidine) -琼脂糖小珠的蛋白质的抗-SCAP、抗-SREBP-1、抗-SREBP-2和抗-ATF6抗体的蛋白质印迹分析显示。图20D显示对于竞争测定,将膜提取物与单独的EtOH、胆甾醇或法图他汀进行预孵育。

[0058] 图21显示了法图他汀对ob/ob小鼠的肝脏和脂肪组织的作用。法图他汀处理的小鼠和对照小鼠的肝脏切片显示染色为红色的脂滴。

[0059] 图22显示了用法图他汀处理的CHO-K1细胞的蛋白质印迹分析。P和N分别表示SREBP-1未裂解的膜前体和裂解的细胞核形式。

[0060] 图23提供了法图他汀、丹酰法图他汀和法图他汀-聚脯氨酸接头-生物素的示例性合成方案。

[0061] 图24显示了在含有无脂质血清的培养基中,法图他汀类似物抑制内源性SREBP激活荧光素酶报道基因的能力。用pSRE-Luc转染CHO-K1细胞。在含有无脂质血清的培养基中用不同浓度的法图他汀、丹酰法图他汀或异丙胺衍生物处理转染的细胞。

[0062] 图25A-25D显示法图他汀减少脂肪生成酶的表达水平和活性。测量ob/ob小鼠肝脏提取物中乙酰辅酶A羧化酶 (ACC) (图25A) 和脂肪酸合酶 (FAS) (图25B) 的活性。进行肝脏粗提物的蛋白质印迹分析 (图25C)。显示了在针对肌动蛋白标准化后法图他汀相对于对照小鼠中不同脂肪生成酶的特定条带的强度的比率 (图25D)。数据表示为平均值 $\pm$ SD,每组n=5只小鼠 ($\dagger P=0.005$; $\ddagger P=0.002$; * $P<0.05$)。

[0063] 图26提供化合物53的合成方案。

[0064] 图27提供化合物19和化合物17的合成方案。

[0065] 图28显示使用示例性类似物45-55和19的标准SREBP激活测定。

[0066] 图29显示使用示例性类似物56-61和19的标准SREBP激活测定。

[0067] 图30显示使用示例性类似物62-66的标准SREBP激活测定。

[0068] 图31显示示例性化合物53的抑制浓度 (sub 50) 数据。

[0069] 图32显示示例性化合物58和61的抑制浓度 (sub 50) 数据。

[0070] 图33A-33B显示化合物19抑制乳腺癌细胞系SUM 159的生长。将细胞以10000个细胞/孔的密度接种在96孔平板中在100 μ l包含2%活性炭处理的血清 (charcoal stripped serum) 的培养基中。24小时后,向所述细胞中加入所示浓度的化合物19,再持续48小时。使用WST-1测定确定细胞存活性。图33A:显示不同浓度的化合物19对细胞生长的作用,由A450nm处的吸光度变化明显所示。图33B:如通过RT-PCR分析确定的,10 μ M处理HePG2细胞显著下调脂肪生成基因的表达水平 (黑色条);值表示为平均值 $\pm$ SD; * $P<0.05$ 。

[0071] 图34A-34C显示化合物19抑制人肝癌细胞系HePG2的生长。将细胞以100000个细胞/孔的密度接种在16孔平板中在包含2%活性炭处理的血清的培养基中。24小时后,向所述细胞中加入所示浓度的化合物19,再持续48小时。图34A显示对照和用25、50和100 μ M化合物19处理的HePG2细胞的照片。图34B显示代表性的蛋白质印迹分析,其显示,与未处理的对照相比,处理的细胞 (T) 具有减少水平的成熟和活性形式的SREBP-1和更高水平的前体。图34C显示,如通过RT-PCR分析确定的,10 μ M处理HePG2细胞显著下调脂肪生成基因的表达水平,并且不影响INSIG2 (已知其不受SREBP调控)。值表示为平均值 $\pm$ SD; * $P<0.05$ 。

[0072] 图35A-35F显示化合物19抑制人急性成淋巴细胞性白血病细胞系MOLT-4和人多发

性骨髓瘤细胞系RPMI8226的生长。将10,000个MOLT-4细胞(图35A-35C)和20,000个RPMI8226细胞(图35D-35F)接种在96孔平板中在包含5%FBS或无脂碳处理血清(FF-FBS)的RPMI 1640培养基中,在37C持续24小时。将MOLT-4和RPMI8226细胞用不同浓度的化合物19再处理48小时(没有DMSO的没有任何东西的对照(None control),有DMSO的赋形剂,在DMSO中1、2、5、10和20 μ M;RPMI8226细胞也用在DMSO中的3 μ M处理)。在48小时结束时,将细胞进行MTT测定,从而确定存活性。值表示为平均值 $\pm$ SD;*P<0.05。

[0073] 图36A-36F显示化合物17抑制人急性成淋巴细胞性白血病细胞系MOLT-4和人多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226的生长。将20,000个MOLT-4细胞(图36A-36C)和20,000个RPMI8226细胞(图36D-36F)接种在96孔平板中在包含5%胎牛血清(FBS)或5%无脂碳处理血清(FF-FBS)的RPMI1640培养基中,在37C持续24小时。然后将细胞用不同浓度的化合物17再处理48小时(没有DMSO的没有任何东西的对照(None control),有DMSO的赋形剂,在DMSO中1、2、3、5、10和20 μ M)。在48小时的处理结束时,将细胞进行MTT测定,从而确定存活性。值表示为平均值 $\pm$ SD(n=3);**P<0.001;***P<0.0001。

[0074] 图37A-37D:在喂饲RD和HFHC饮食三周后,SD大鼠的体重和成分(胖和瘦)。将初始体重约为193 $\pm$ 7.0克/只大鼠的6-7周龄的雄性SD大鼠喂饲普通饮食(RD)或高脂肪高碳水化合物饮食三周。使用ECHO MRI法¹⁵测量体重(图37B)、脂肪重量(图37C)和瘦肉重量(lean weight)(图37D)含量。(*P<0.05)

[0075] 图38A-38B显示在用化合物19处理八周后累积的体重增加(图38A)和食物摄入(图38B)。将SD大鼠喂饲HFHC饮食达三周,之后开始通过口服强饲法用不同剂量的化合物19或棉籽油赋形剂再处理八周。测量体重和食物摄入,并且计算累积值。(值是平均值+S.E.M;*P<0.05;处理的与对照赋形剂组相比较)。

[0076] 图39A-39E显示通过ECHO MRI法确定的身体成分脂肪和瘦体重(lean mass)。图39A显示在施用化合物19后以克为单位的总体重。图39B显示在施用化合物19后以克为单位的总体脂。图39C显示在施用化合物19后每只动物的脂肪百分数。图39D显示在施用化合物19后以克为单位的总瘦体重。图39E显示在施用化合物19后的每克的百分比瘦体重。不同实验组的大鼠每两周进行一次身体成分分析。由相对于体重的脂肪和质量的重量计算脂肪和瘦体质的百分数。图39B-39E中的标记对应于图39A中相同的组。星号表示处理组与对照组之间的显著差异(*P<0.05)。数据是平均值 $\pm$ S.E.M(n=15)。

[0077] 图40A-40D显示化合物19对喂饲HFHC的SD大鼠肝脏的作用。图40A:处理的(2.5和10mg/kg)和对照大鼠的代表性的肝脏(每组n=5只)。图40B:肝脏冷冻切片的Oil Red O染色。油滴显示为红色。条表示200微米。图40C:来自对照和处理的动物的肝组织中的TG和胆甾醇水平;图40D:通过实时PCR测量的,与对照相比,在处理的大鼠中由SREBP-1和2控制的基因表达的倍数变化。ACC:乙酰辅酶A羧化酶;ACL:ATP柠檬酸裂解酶;SCD:硬脂酰-辅酶A去饱和酶,MVD甲羟戊酸脱羧酶;LDLR;LDL受体;INSIG-1:胰岛素诱导基因1;平均值 $\pm$ SE;*P<0.05。

[0078] 图41显示与对照相比在用化合物19处理的大鼠中UCP2的基因表达的倍数变化。从对照和用所示剂量的化合物19处理的大鼠的肝组织中提取总RNA,并且使用实时PCR确定UCP mRNA的水平。

[0079] 发明详述

[0080] 发明的一般实施方案

[0081] 使用本发明的化合物治疗和/或预防代谢病症。例如,失调的脂肪酸和胆甾醇的生物合成和饮食脂肪的过量摄入与多种医学并发症相关,至少包括肥胖、糖尿病、高血压和心血管病,并且在某些方面中,这些病况使用本发明的化合物进行治疗和/或预防。流行病学证据表明包括肥胖在内的代谢疾病还促使发展侵入形式的癌症,包括,但不限于,前列腺癌。

[0082] 脂肪消耗时,甾醇调控元件结合蛋白(SREBP)从膜蛋白水解释放并易位到细胞核内,它们在核内激活参与胆甾醇和脂肪酸生物合成的基因的转录。本发明将之前已知能阻断脂肪形成和癌细胞生长的合成小分子鉴定为SREBP激活的选择性抑制剂,并且还提供了该分子的类似物和衍生物。药物样分子法图他汀A削弱SREBP的蛋白水解激活,从而降低其响应基因(responsive genes)在细胞内的转录。在小鼠中,法图他汀A阻断肝中SREBP-1的激活,减轻体重,降低血液胆甾醇和葡萄糖水平,并下调脂肪生成酶。在经过处理的小鼠的肝中脂肪酸合酶和乙酰辅酶A羧化酶活性及其表达水平降低。在某些方面中,法图他汀A用作理解细胞途径的工具,并且提供共有分子作为至少代谢疾病的药物干预的起点。

[0083] 在特定的实施方案中,调控代谢相关表型的小分子用作剖析复杂的相关性的工具。法图他汀A在培养的哺乳动物细胞中导致两种不同的表型:3T3-L1小鼠成纤维细胞的胰岛素诱导的脂肪生成的完全抑制;和DU145人前列腺癌细胞的不依赖血清的胰岛素样生长因子1(IGF1)依赖性生长的选择性阻抑。

[0084] 在本发明的某些方面,法图他汀A选择性阻断SREBP的激活,SREBP是激活参与胆甾醇和脂肪酸合成的特定基因的关键脂肪生成转录因子。法图他汀A被鉴定为SREBP的抑制剂与其抗脂肪生成性质一致,并且指明SREBP在前列腺癌的IGF1-依赖性生长中的作用。本发明涉及阻断至少SREBP-1的激活(例如如在实验小鼠中所示)的法图他汀A,优选地其类似物和衍生物化合物。给肥胖ob/ob小鼠施用法图他汀A导致体重减轻和内脏脂肪的显著减少。并且,在体重减轻过程中,解偶联蛋白1、解偶联蛋白2和解偶联蛋白3的表达增加,生热作用增加,而瘦体重没有减少。

[0085] 本发明涉及代谢病症的至少一种症状的治疗和/或预防。代谢病症可以是任何类型,只要用本发明的化合物改善或防止其症状之一即可。具体地,代谢疾病源自一种或多种先天性代谢缺陷(其可称为遗传性病症),如由缺陷的代谢酶(例如具有一个或多个突变或无序的酶,包括调控蛋白和转运机制中的突变)引起的遗传性状。

[0086] 通常,代谢病症可定义为影响细胞能量产生的病症。虽然大多数代谢病症是遗传性的,一些病症可能是一种或多种因素导致的获得性疾病,这些因素包括饮食、毒素、感染等。遗传性代谢病症可能是遗传缺陷引起的,所述遗传缺陷导致细胞代谢过程中的某一步骤所必需的酶的缺失或不恰当构建。最大类别的代谢病症包括下述:1)糖原贮积病(glycogen storage diseases)(也称为糖原病(glycogenosis)或糊精聚积病(dextrinosis)),包括影响碳水化合物代谢的病症;2)脂肪氧化病症,其影响脂肪代谢和脂肪组分的代谢;和3)线粒体病症,其影响线粒体。糖原贮积病(GSD)的实例至少包括I型GSD(葡萄糖-6-磷酸酶缺乏;冯吉尔克氏病(von Gierke's disease));II型GSD(酸性麦芽糖酶缺乏;庞佩氏病(Pompe's disease));III型GSD(糖原脱支酶缺乏;柯里氏病(Cori's disease)或福布斯病(Forbe's disease));IV型GSD(糖原分支酶缺乏;安德森病(Andersen disease));V型GSD(肌糖原磷

酸化酶缺乏;麦卡德尔病 (McArdle disease));VI型GSD (肝磷酸化酶缺乏,赫斯病 (Hers's disease));VII型GSD (肌磷酸果糖激酶缺乏;塔里病 (Tarui's disease));IX型GSD (磷酸化酶激酶缺乏);和XI型GSD (葡萄糖转运体缺乏;范科尼-比克尔病 (Fanconi-Bickel disease))。

[0087] 在某些实施方案中,脂肪酸代谢缺乏可描述为脂肪氧化病症或脂质贮积病。例如,它们可能涉及影响身体在例如肌肉、肝脏和其他细胞类型内氧化脂肪酸以产生能量的能力的酶缺乏所导致的一种或多种先天性代谢缺陷。脂肪酸代谢缺乏的例子至少包括:辅酶A脱氢酶缺乏;其他辅酶A酶缺乏;肉毒碱相关病症;或脂质贮积病。辅酶A脱氢酶缺乏的例子至少包括:极长链酰基-辅酶A脱氢酶缺乏 (VLCAD);长链3-羟基酰基-辅酶A脱氢酶缺乏 (LCHAD);中链酰基-辅酶A脱氢酶缺乏 (MCAD);短链酰基-辅酶A脱氢酶缺乏 (SCAD);和短链L-3-羟基酰基-辅酶A脱氢酶缺乏 (SCHAD)。其他辅酶A酶缺乏的例子至少包括:2,4-二烯酰辅酶A还原酶缺乏;3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶A裂解酶缺乏;和丙二酰辅酶A脱羧酶缺乏。肉毒碱相关缺乏的例子至少包括:原发性肉毒碱缺乏;肉毒碱-酰基肉毒碱转位酶缺乏;肉毒碱棕榈酰转移酶I缺乏 (CPT);和肉毒碱棕榈酰转移酶II缺乏 (CPT)。脂质贮积病的例子包括酸性脂酶疾病;沃尔曼病 (Wolman disease);胆甾醇酯沉积病 (cholesteryl ester storage disease);戈谢病 (Gaucher disease);尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease);法布里病 (Fabry disease);法伯病 (Farber's disease);神经节苷脂贮积病 (gangliosidoses);克拉伯病 (Krabbe disease);和异染性脑白质营养不良 (metachromatic leukodystrophy)。其他脂肪酸代谢病症至少包括线粒体三功能性蛋白质缺乏;电子传递黄素蛋白 (ETF) 脱氢酶缺乏 (GAII和MADD);丹吉尔病 (Tangier disease);和妊娠急性脂肪肝。线粒体病的例子至少包括进行性外眼肌麻痹 (progressive external ophthalmoplegia,PEO);糖尿病和耳聋 (DAD);雷伯遗传性视神经病 (Leber hereditary optic neuropathy,LHON),线粒体脑肌病 (Mitochondrial encephalomyopathy),乳酸性酸中毒 (lactic acidosis) 和中风样综合征 (stroke-like syndrome,MELAS);肌阵挛性癫痫症和蓬毛样红纤维 (Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers,MERRF);利氏综合征 (Leigh syndrome);亚急性硬化性脑病 (subacute sclerosing encephalopathy);神经病、共济失调、色素性视网膜炎和下垂 (Neuropathy,ataxia,retinitis pigmentosa,and ptosis,NARP);卡恩斯-塞尔综合征 (Kearns-Sayre syndrome,KSS);肌神经源性胃肠脑病 (Myoneurogenic gastrointestinal encephalopathy,MNGIE)。在本发明具体的方面中,代谢病症是下述中的一种或多种或者具有下述中的一种或多种作为其并发症之一:肥胖、高脂血症 (hyperlipemia)、糖尿病、脂肪肝、高血压和心血管病。

[0088] 本发明涉及与细胞过度增生相关的疾病的治疗。在具体的实例中,细胞过度增生可以由癌症或其他肿瘤性疾病或病症引起。没有限制,所述过度增生性疾病可以是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、前列腺癌、消化道癌、尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、淋巴瘤、肉瘤、黑素瘤、白血病、多发性骨髓瘤或实体瘤的远处转移。

[0089] 发明的一般化合物

[0090] 一般地,本发明提供具有下述通式的化合物或其药用盐和立体异构体:

[0091] A-B-C

[0092] 其中A、B和C可相同或不同,并且各自可以是5-、6-或7-元环或耦合的双环系统,所

述环是杂环或非杂环、取代的环或非取代的环,A、B和C直接连接或者通过插入的原子链或接头连接,并且所述原子链或接头是具有或不具有另外的官能团的饱和的碳链或不饱和的碳链。

[0093] 优选地,A环是具有一个杂原子的6元杂环。A环可被取代。在优选的实施方案中,该环是吡啶环;更优选地,吡啶环的氮原子在相对于B环位置的4位或2位。最优选地,吡啶环在处于相对于氮杂原子的 α 位的碳上被正丙基取代。在其他优选的实施方案中,A环上存在1-5个原子的侧链,更优选地1-5个碳的侧链。在其他示例性且非限制性的实施方案中,A环可以例如是苯基、吡咯、噻吩、呋喃、嘧啶、异噻啉、噻啉、苯并呋喃、吡啶、咪唑、噻唑、萘基、哌啶、吡咯烷、咪唑、咪唑[1,2-a]吡啶、苯并咪唑、噻唑或苯并噻唑。

[0094] 在本发明的一个方面中,A环是哌啶环。优选地,哌啶环上的氮原子在相对于B环位置的4位。在其他相关的方面中,哌啶环上的氮原子在相对于B环位置的3位。哌啶的氮原子可以进一步被取代,并且其中所述取代选自由下述组成的组:烷基,亚砷,砷,烷基或芳基磺酸酯,磺酸,以及它们的任意组合。例如,取代可以是丙基基团,叔丁基氧基羰基(BOC)或苄基氧基羰基基团。

[0095] 本发明另一个方面中,A环是吡咯烷环;优选地,吡咯烷环上的氮原子在相对于B环位置的2位。吡咯烷的氮原子可以进一步被取代,并且其中所述取代选自由下述组成的组:烷基,亚砷,砷,烷基或芳基磺酸酯,磺酸,以及它们的任意组合。例如,取代可以是丙基基团,叔丁基氧基羰基(BOC)或苄基氧基羰基基团。

[0096] 优选地,B环是具有至少两个杂原子的5-元环。B环可被取代。在优选的实施方案中,B环是噻唑环。在其他示例性且非限制性的实施方案中,B环可以是例如噻唑、咪唑、异噻唑、咪唑、噻吩、呋喃、嘧啶、吡啶、异噻唑、噻唑并吡啶、芳基或吡啶。B环还可以是具有两个杂原子的6-元环。例如,B环是哌嗪环。优选地,C环是6-元环,最优选地是苯环。C环可以被取代。在优选的实施方案中,C环是甲基取代的。在其他示例性且非限制性的实施方案中,C环可以例如是苯基、吡啶、吡咯、噻吩、呋喃、嘧啶、异噻啉、噻啉、苯并呋喃、吡啶、咪唑或萘基。

[0097] 示例性的化合物提供在图14A-14F和表3与4中。参考化合物1,正丙基取代的吡啶环对应于通式的A环,2,4-取代的噻唑环对应于通式的B环,并且甲基取代的苯环对应于通式的C环。应理解,取代允许在A、B和C环中任何一个的任意位置,并且任一取代可以与任何其他取代相同或者不同。除了图14A-14F所示的那些之外,取代的非限制性例子还包括下组:H(即,未取代的);羟基; C_{1-10} 烷基; C_{2-10} 烯基; C_{2-10} 炔基; C_{3-6} 环烷基;芳基;杂芳基;其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基和杂芳基任选地被1-5个选自由下述组成的组的基团所取代:羟基; $-(C=O)R^a$; $-(C=O)OR^a$; $-(C=O)H$; $-(C=O)OH$; $O(CH_2)_nCOOR^a$,其中 $n=1-10$,并且其中 R^a 是 C_{1-10} 烷基, C_{2-10} 烯基, C_{2-10} 炔基,或 C_{3-6} 环烷基,芳基,杂芳基,氟,氯,溴,碘,氰基,羧基,氨基,单取代的氨基和二取代的氨基,单取代的酰氨基和二取代的酰氨基以及它们的任意组合; $-(C=O)R^a$; $-(C=O)OR^a$; $-(C=O)H$; $-(C=O)OH$; $-O(CH_2)_nCOOR^a$,其中 $n=1-10$,并且其中 R^a 是 C_{1-10} 烷基, C_{2-10} 烯基, C_{2-10} 炔基,或 C_{3-6} 环烷基,芳基或杂芳基,氟,氯,溴,碘;氰基;羧基;氨基;酰胺基,具有选自由下述组成的组的取代的单取代和二取代的氨基: C_{1-10} 烷基, C_{2-10} 烯基, C_{2-10} 炔基, C_{3-6} 环烷基,芳基,杂芳基,亚砷,砷,磺酸酯,烷基磺酸酯,磺酸以及它们的任意组合;其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基和杂芳基任选地被1-5个选自由下述

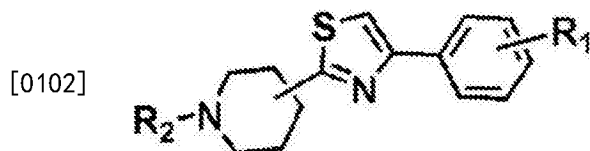
组成的组的基团所取代：羟基、 $-(C=O)R^a$ 、 $-(C=O)OR^a$ 、 $-(C=O)H$ 、 $-(C=O)OH$ 、 $-O(CH_2)_nCOOR^a$ ，其中 $n=1-10$ ，并且其中 R^a 是 C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基，或 C_{3-6} 环烷基，芳基和杂芳基；氟；氯；溴；碘；氰基；羧基；氨基；具有一个或多个下述基团的单取代的和二取代的氨基： C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基基团，以及它们的任意组合；以及，具有选自由下述组成的组的取代的单取代和二取代的酰胺基： C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基， C_{3-6} 环烷基，芳基，杂芳基，亚砷，砷，磺酸酯，烷基磺酸酯，磺酸，磺酸酯，烷基磺酸酯，磺酸以及它们的任意组合；其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基和杂芳基任选地被1-5个选自由下述组成的组的基团所取代：羟基； $-(C=O)R^a$ ； $-(C=O)OR^a$ ， $-(C=O)H$ ； $-(C=O)OH$ 、 $-O(CH_2)_nCOOR^a$ ，其中 $n=1-10$ ，并且其中 R^a 是 C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基，或 C_{3-6} 环烷基，芳基或杂芳基；氟；氯；溴；碘；氰基；羧基；氨基；具有一个或多个下述基团的单取代和二取代的酰胺基： C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基基团，以及它们的任意组合。

[0098] 在本发明中，有具有下述通式的化合物或其药用盐或立体异构体： $A-B-C$ ，其中A、B和C相同或不同，并且其中各自包括5-、6-或7-元环或稠合的双环系统，所述环是杂环或非杂环、取代的环或非取代的环，其中A、B和C直接连接或通过插入的原子链或接头连接，并且其中所述原子链或接头是具有或不具有另外的官能团的饱和的碳链或不饱和的碳链，其中所述A、B和C中的任一个、任两个或全部三个都是未取代的或具有一个或多个取代，并且其中任一取代基可与任何其他取代相同或不同，并且其中所述取代由下述组成：a) 羟基，b) C_{1-10} 烷基，c) C_{2-10} 烯基，d) C_{2-10} 炔基，e) C_{3-6} 环烷基，f) 芳基，g) 杂芳基，其中b) , c) , d) , e) , f) 和/或g) 中的所述取代任选地进一步被由下述组成的1-5个基团取代：1) 羟基，2) $-(C=O)R^a$ ，3) $-(C=O)OR^a$ ，4) $-(C=O)H$ ，5) $-(C=O)OH$ ，6) $-O(CH_2)_nCOOR^a$ ，其中 $n=1-10$ ，7) 卤素，8) 氰基，9) 羧基，10) 氨基，11) 单取代的氨基，12) 二取代的氨基，13) 酰胺基，14) 单取代的酰胺基；15) 二取代的酰胺基，以及它们的任意组合，其中在2) , 3) 或6) 中， R^a 是 C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基， C_{3-6} 环烷基，芳基或杂芳基，h) $-(C=O)R^a$ ，i) $-(C=O)OR^a$ ，j) $-(C=O)H$ ，k) $-(C=O)OH$ ；l) $-O(CH_2)_nCOOR^a$ ，其中 $n=1-10$ ，其中在h) , i) 或l) 中， R^a 是 C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基， C_{3-6} 环烷基，芳基或杂芳基，m) 卤素，n) 氰基，o) 羧基，p) 氨基，q) 单取代的氨基，r) 二取代的氨基，s) 酰胺基，t) 单取代的酰胺基，和u) 二取代的酰胺基，其中所述单取代的氨基、二取代的氨基、单取代的酰胺基和二取代的酰胺基中的一个或多个具有选自由下述组成的组的取代： C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基， C_{3-6} 环烷基，芳基，杂芳基，亚砷，砷，磺酸酯，烷基磺酸酯，磺酸，以及它们的任意组合，其中在u) 中，所述烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基或杂芳基任选地进一步被1-5个选自由下述组成的组的基团取代：i) 羟基，ii) $-(C=O)R^a$ ，iii) $-(C=O)OR^a$ ，iv) $-(C=O)H$ ，v) $-(C=O)OH$ ，vi) $-O(CH_2)_nCOOR^a$ ，其中 $n=1-10$ ，其中在ii) , iii) 或vi) 中， R^a 是 C_{1-10} 烷基， C_{2-10} 烯基， C_{2-10} 炔基， C_{3-6} 环烷基，芳基或杂芳基，vii) 卤素，viii) 氰基，ix) 羧基，x) 氨基，xi) 单取代的氨基，xii) 二取代的氨基，xiii) 酰胺基；xiv) 单取代的酰胺基，xv) 二取代的酰胺基，以及它们的任意组合。

[0099] 示例性的化合物、组合物、制剂和使用方法

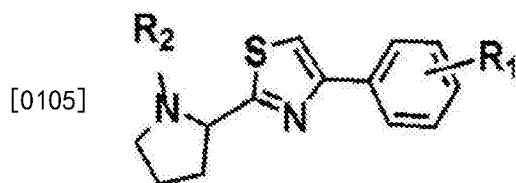
[0100] 在本发明的一个实施方案中，提供具有化学结构A-B-C的化合物，其中A是吡啶或取代的吡啶、哌啶或取代的哌啶、吡咯烷或取代的吡咯烷、噻唑或取代的噻唑、苯环或取代的苯环；B是噻唑或取代的噻唑、哌嗪或取代的哌嗪、苯环或取代的苯环；并且C是苯环或取代的苯环，吡啶或取代的吡啶，噻唑或取代的噻唑。

[0101] 在一个优选的方面中,所述化学结构是:



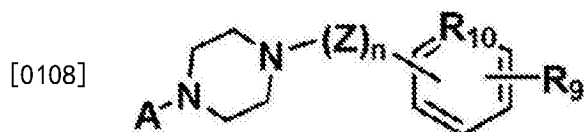
[0103] 其中R₁是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷氧基、-OC(O)R₃;R₃是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₄;R₄是H或C₁₋₃烷基、-NHR₅;R₅是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₆氨基甲酸酯;R₆是叔丁基或苄基甲基或-NH-SO₂-R₇磺酰胺;R₇是烷基或芳基,R₂是烷基或R₈OC(O)-,并且R₈是C₃₋₅烷基或芳基。特别地,所述卤素可以是溴。

[0104] 在另一个优选的方面中,所述化学结构是:

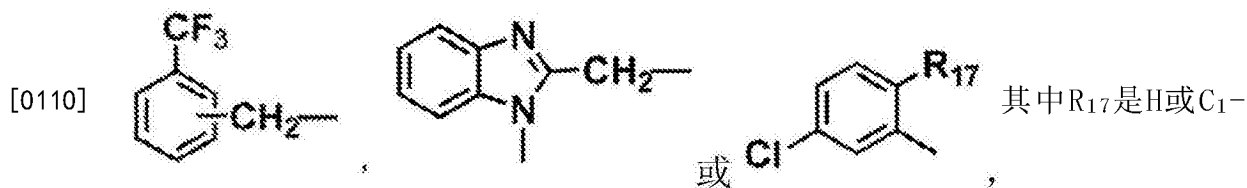


[0106] 其中R₁是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷氧基、-OC(O)R₃;R₃是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₄;R₄是H或C₁₋₃烷基、-NHR₅;R₅是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₆氨基甲酸酯;R₆是叔丁基或苄基甲基或-NH-SO₂-R₇磺酰胺;R₇是烷基或芳基,R₂是烷基或R₈OC(O)-,并且R₈是C₃₋₅烷基或芳基。特别地,所述卤素可以是溴。

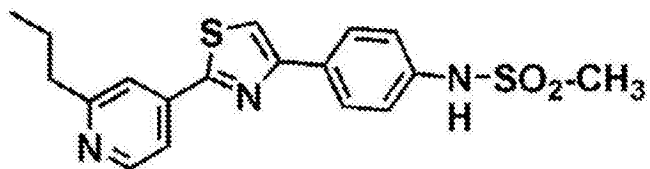
[0107] 在另一个优选的方面中,所述化学结构是:



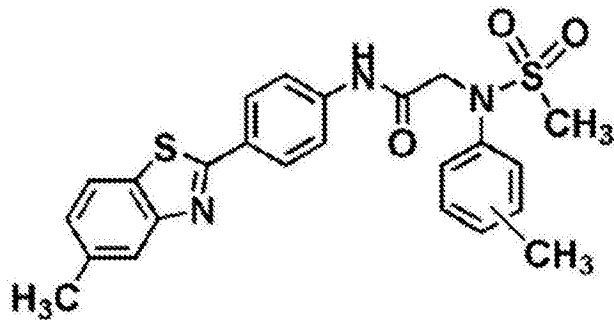
[0109] 其中R₉是H、卤素、-OH、-O-C₁₋₃烷氧基、-OC(O)R₁₁;R₁₁是C₁₋₃烷基或芳基、-OCH₂-C(O)OR₁₂;R₁₂是H或C₁₋₃烷基、-NHR₁₃;R₁₃是H、C₁₋₄烷基、烷基环丙烷、苄基、-NHC(O)C₁₋₃酰胺、-NHC(O)O-R₁₄氨基甲酸酯;R₁₄是叔丁基或苄基甲基、-NH-SO₂-R₁₅磺酰胺;R₁₅是烷基或芳基或-SO₂-NH-R₁₆磺酰胺;R₁₆是烷基或芳基,R₁₀是氮或亚甲基,n是0或1,并且当n是1时,Z是-C=O;并且A是

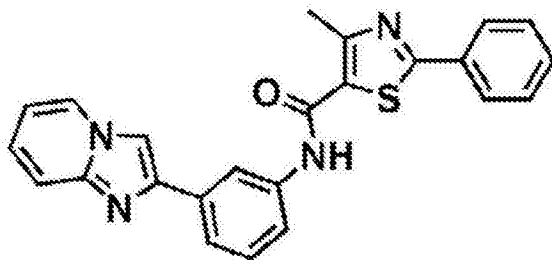
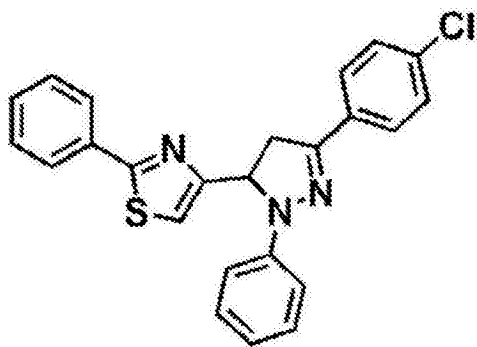


[0111] 在另一个优选的方面中,所述化学结构是:

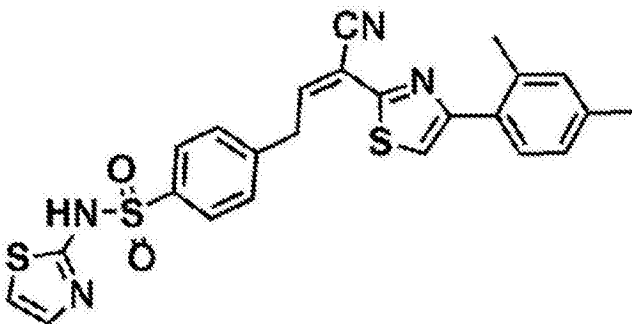
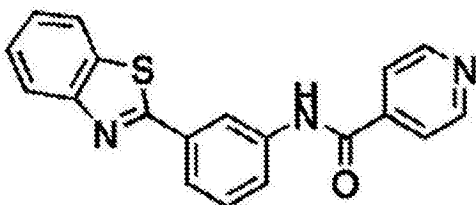
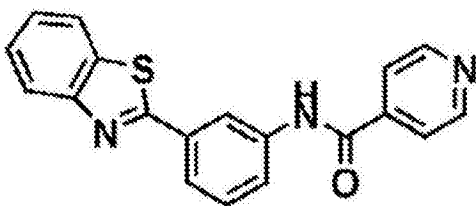


[0112]





[0113]



[0114] 在相关的实施方案中,提供包含前述化合物和药用赋形剂的药物组合物。在另一个相关的实施方案中,提供被配制成食物、动物饲料材料或药物的前述化合物。在另一个相关的实施方案中,提供包含前述化合物和容纳所述化合物的容器的试剂盒。所述容器可以是适合存储本领域已知的药物且可商购获得的任意适当的容器。

[0115] 在本发明另一个实施方案中,优选的化合物是N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)甲烷磺酰胺,2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯,2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯,4-(4-溴苯基)-2-(吡咯烷-2-基)噻唑,4-(4-溴苯基)-2-(1-丙基吡咯烷-2-基)噻唑,3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯,3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)-1-丙基哌啶,4-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,(R)-2-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯,3-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,4-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯,4-(3-(吡啶-2-基)-[1,2,4]三唑并[4,3-b]哒嗪-6-基)-N-甲苯磺酰基苯胺,(4-(5-氯-2-甲基苯基)哌嗪-1-基)(4-(甲苯磺酰基氨基)苯基)甲酮,4-(4-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)-N-甲苯磺酰基苯胺,3-氯-4-甲基-N-(6-(4-(3-(三氟甲基)苄基)哌嗪-1-基)吡啶-3-基)苯磺酰胺,4-氯-N-(4-(4-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)苯基)苯磺酰胺,(Z)-4-(3-氰基-3-(4-(2,4-二甲基苯基)噻唑-2-基)烯丙基)-N-(噻唑-2-基)苯磺酰胺,N-(3-(H-咪唑并[1,2-a]吡啶-2-基)苯基)-4-甲基-2-苯基噻唑-5-甲酰胺,N-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)苯基)异烟酰胺,3-(4-氯苯基)-4,5-二氢-1-苯基-5-(2-苯基噻唑-4-基)-1H-吡唑,N-(4-(6-甲基苯并[d]噻唑-2-基)苯基)-2-(N-间甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺,N-(4-(6-甲基苯并[d]噻唑-2-基)苯基)-2-(N-对甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺;其药用盐;立体异构体;或它们的任意组合。

[0116] 在本发明的另一个实施方案中,提供用于治疗动物中的代谢病症的方法,所述方法包括给所述动物施用治疗有效量的至少一种前述化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合的步骤。

[0117] 对该实施方案进一步地,所述方法包括给所述动物提供第二疗法的步骤。在该进一步的实施方案中,所述第二疗法包括饮食疗法、物理疗法、行为疗法、手术、药物治疗、化疗或其组合。特别地,所述第二疗法可以是生活方式改变、抗高血糖剂、胰岛素、胰高血糖素样肽(GLP)、二肽基肽酶-4抑制剂、噻唑烷二酮、降脂化合物或它们中两种以上的组合。

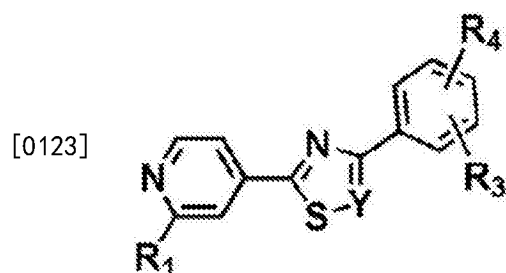
[0118] 在两个实施方案中,所述代谢病症是体重相关的病况,与细胞过度增生相关的疾病,高脂血症,糖尿病或其并发症,脂肪肝,高血压或心血管病。特别地,所述代谢病症可以是肥胖,高血压,动脉硬化(arteriosclerosis),哮喘(asthma),高脂血症(hyperlipidemia),高胰岛素血症(hyperinsulinemia),非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver)和由胰岛素抵抗导致的2型糖尿病。在这些实施方案的一个方面中,所述代谢病症是体重相关的病症,其中所述治疗有效量的化合物增加解偶联蛋白1、解偶联蛋白2或解偶联蛋白3的表达。此外,在该方面中,在动物的体重减轻过程中,所述治疗有效量的化合物增加生热作用,而不减少瘦体重。在另一个方面中,与细胞过度增生相关的疾病是癌症。特别地,所述癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、前列腺癌、消化道癌、尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、淋巴瘤、肉瘤、黑素瘤、白血病或实体瘤的远处转移。

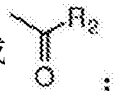
[0119] 在另一个实施方案中,提供用于治疗有此需要的患者中的细胞过度增生疾病的方法,所述方法包括给所述患者施用治疗有效量的至少一种前述化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合的步骤。特别地,所述细胞过度增生疾病可以是前文所述的癌症。

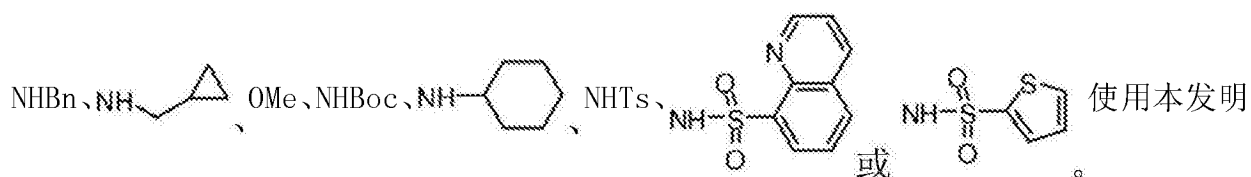
[0120] 在相关的实施方案中,提供用于治疗有此需要的患者中的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的一种或多种前述药物组合物的步骤。所述癌症可以如本文所述。

[0121] 在另一个实施方案中,提供用于减轻有此需要的动物的体重的方法,所述方法包括给所述动物施用在药用介质中的治疗有效量的一种或多种前述化合物的步骤。

[0122] 在本发明的另一个实施方案中,提供用于在动物体重减轻过程中增加生热作用而不减少瘦体重的方法,所述方法包括给所述动物施用在药用介质中的治疗有效量的化合物或其药用盐或立体异构体或它们的组合的步骤,所述化合物具有下述结构:



[0124] 其中R₁取代基是H、Et、OMe或正丙基;Y是CH或 ; R₂是OH、OMe或NH-i-Pr; R₃是H、F或Cl; R₄是H、Me、Cl、Br、F、OH、OBz、OCH₂COOMe、OCH₂COOH、NH₂、NH-i-Pr、NHCOMe、NHSO₂Me、



的方法,在施用所述化合物后,动物的总体脂减少。

[0125] 在所有这些实施方案及其方面中,本领域普通技术人员能够依据所述待治疗的代谢病症或需要的结果容易地确定本发明的化合物的有用剂量,所述代谢病症诸如,但不限于,与细胞过度增生相关的疾病或体重相关的病症。典型地,所述化合物以约1mg/kg至约100mg/kg的剂量施用。所述化合物可以在以食物、动物饲料材料或药物形式存在的组合物中施用。在优选的方面中,通过在伴有或不伴有同时的瘦体重减少的情况下增加无联系的生热作用来减轻动物的体重。典型地,所述化合物增加解偶联蛋白的表达。解偶联蛋白的代表性例子包括解偶联蛋白1、解偶联蛋白2和解偶联蛋白3。本发明的方法可用于多种情形,包括,但不限于,其中动物患有选自由下述组成的组的体重相关的病况:肥胖,高血压,动脉硬化,哮喘,高脂血症,高胰岛素血症,非酒精性脂肪肝和由胰岛素抵抗导致的2型糖尿病。并且,本领域普通技术人员将容易地认识到给所述动物提供第二疗法的用途,所述第二疗法包括,但不限于,生活方式改变,抗高血糖剂,胰岛素,胰高血糖素样肽 (GLP),二肽基肽酶-4抑制剂,噻唑烷二酮,降脂化合物和它们中两种以上的组合。

[0126] 当用于本说明书时,“一个”(“a”或“an”)可以意指一个或多个。当用在权利要求书中时,当与词语“包括”联合使用时,词语“一个”(“a”或“an”)可以意指一个或多于一个。用于本文时,“另一个”可以意指至少第二个或更多。在具体的实施方案中,例如,本发明的方面可以“基本上由本发明的一个或多个序列组成”或“由本发明的一个或多个序列组成”。本发明的一些实施方案可以由一个或多个本发明的元件、方法步骤和/或方法组成或基本上

由一个或多个本发明的元件、方法步骤和/或方法组成。预期本发明所述的任意方法或组合物可以根据本文所述的任意其他的方法或组合物来实现。

[0127] 术语“动物”用在本文中是指哺乳动物,优选人、患者、受试者或个体,其接受或已经施用本文所述的一种或多种化合物、组合物或制剂。

[0128] 术语“烷基”用在本文中是指从直链或支链无环饱和烃概念性去除一个氢原子所得到的取代的单价基团(即, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 等)。

[0129] 术语“烯基”用在本文中是指从含有至少一个碳-碳双键的直链或支链无环不饱和烃概念性去除一个氢原子所得到的取代的单价基团(即, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $-\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 等)。

[0130] 术语“炔基”用在本文中是指从含有至少一个碳-碳三键的直链或支链无环不饱和烃概念性去除一个氢原子所得到的取代的单价基团(即, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ 等)。

[0131] 术语“芳氧基”用在本文中是指具有桥接氧原子的芳基,如苯氧基($-\text{OC}_6\text{H}_5$)或苯甲酰氧基($-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$)。“芳基氨基”意指具有桥接胺官能团的芳基,例如 $-\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 。“芳基酰胺基”意指具有桥接酰胺基团的芳基,例如 $-(\text{C}=\text{O})\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 。

[0132] 术语“亚烷基”用在本文中是指从直链或支链无环饱和烃的同一碳原子概念性去除两个氢原子所得到的取代的二价基团(即 $=\text{CH}_2$, $=\text{CHCH}_3$, $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 等)。

[0133] 术语“环烷基”用在本文中是指从饱和单环烃概念性去除一个氢原子所得到的取代的单价基团(即,环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基)。

[0134] 术语“芳基”用在本文中是指从单环或双环芳族烃概念性去除一个氢原子所得到的取代的单价基团。芳基基团的例子有苯基、茚基和萘基。

[0135] 术语“杂芳基”用在本文中是指从含有1、2、3或4个选自N、O或S的杂原子的单环或双环芳族环系统概念性去除一个氢原子所得到的取代的单价基团。杂芳基基团的例子包括但不限于:吡咯基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、吡唑基、**噁唑基**、异**噁唑基**、噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、苯并咪唑基、吡啶基和嘌呤基。杂芳基取代基可连接于碳原子或通过杂原子连接。单环杂芳基基团的例子包括:吡咯基、呋喃基、噻吩基、吡唑基、**噁唑基**、异**噁唑基**、噻唑基和吡啶基。双环杂芳基基团的例子包括:嘧啶基、吡嗪基、苯并咪唑基、吡啶基和嘌呤基。单个环可具有5或6个原子。因此,这包括4元单环杂芳基基团和5-元单环杂芳基基团。也包括具有一个5-元环和一个6-元环的双环杂芳基基团和具有2个6-元环的双环杂芳基基团。

[0136] 术语“卤素”包括碘、溴、氯和氟。

[0137] 术语“取代的”应理解为包括取代基的多重取代度。当化学基团或结构部分上的原子价被除氢之外的原子或官能团满足时发生取代。如果是多重取代,取代的化合物可被一个或多个所公开的或声称的取代基结构部分以单数或复数形式独立地取代。独立取代表示所述(两个或更多个)取代基可以相同或不同。

[0138] 术语“药用盐”在本文中是指具有所需的母体化合物的药理学活性的化合物的盐。这种盐包括:(1)酸加成盐,与无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等形成;或与有机酸如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、延

胡索酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰)苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基双环[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等形成；或(2)母体化合物中存在的酸性质子被金属离子如碱金属离子、碱土金属离子或铝离子取代时形成的盐；或与有机碱如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡萄糖胺等配位形成的盐。

[0139] 术语“立体异构体”意指原子连接性与一种或多种其他分子相同但原子空间排列不同的异构分子。该定义包括对映异构体、非对映异构体、顺式异构体、反式异构体、构象异构体。

[0140] 术语“未取代的”意指化学基团或结构部分上的所有原子价被氢饱和。

[0141] 术语“饱和的碳链”用在本文中是指直链或支链的无环饱和烃(即, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 等)。

[0142] 术语“不饱和的碳链”用在本文中是指包含至少一个碳-碳双键(即, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $-\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 等)或至少一个碳-碳三键(即, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2-$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ 等)的直链或支链无环不饱和烃。

[0143] 本发明还包括本文所公开的化合物受保护的衍生物。例如,当本发明的化合物包含诸如羟基或羰基的基团时,这些基团可用适当的保护基进行保护。合适的保护基的列表参见T.W.Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis* (有机合成中的保护基), John Wiley&Sons, Inc. 1981, 其公开内容被完全纳入本文作为参考。本发明化合物受保护的衍生物可通过本领域所熟知的方法进行制备。

[0144] 本发明的化合物可具有不对称中心、手性轴和手性平面,并且作为外消旋物、外消旋混合物和单独的非对映异构体及其所有可能的异构体和混合物存在,包括光学异构体,都包括在本发明范围内。此外,本文所公开的化合物可以互变异构体形式存在,并且两种互变异构体形式都涵盖在本发明的范围内,即使只描述了一种互变异构体的结构。

[0145] 在本发明的一个具体实施方案中,本发明的组合物靶向甾醇调控元件结合蛋白(SREBP)途径的一个或多个成员。该途径涉及膜结合转录因子SREBP的蛋白水解释放,在具体方面,这促进从胞浆向细胞核的转运。在细胞核中,SREBP与编码脂质产生相关的酶的基因的调控区中存在的被称为甾醇调控元件(SRE)的元件结合。SREBP与DNA结合后,调节靶基因的转录,例如上调。

[0146] 药物制剂

[0147] 本发明的药物组合物包含溶解或分散在药用载体中的有效量的一种或多种本发明的组合物(适当时也包含另外的试剂)。短语“药用或药理学可用的载体”是指适当施用给动物(例如人)不会产生副作用、过敏或其他不良反应的分子实体和组合物。根据本发明的公开内容,含有至少一种法图他汀A类似物或衍生物或其他活性成分的药物组合物的制备是本领域技术人员已知的,如Remington's *Pharmaceutical Sciences* (雷明顿药典),第18版.Mack Printing Company, 1990所示例的。而且,对于动物(例如人)给药,应理解制剂应符合无菌性、致热原性、总体安全性和纯度标准,如FDA生物标准局所要求的那样。

[0148] 如本文所用,“药用载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(如抗细菌剂、抗真菌剂)、等张剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、类似物质以及它们的组合,如本领域普通技术人员所知(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药典),第18版.Mack Printing Company,1990,第1289-1329页)。目前除了任何与活性成分不相容的常规载体之外,预期其在药物组合物中的应用。

[0149] 取决于其是以固体、液体还是气溶胶形式施用,以及其是否需要诸如注射的给药途径是无菌的,法图他汀A类似物或衍生物可以包含不同类型的载体。本发明可以静脉内、真皮内、经皮、鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、局部、肌内、皮下、粘膜内、口服、局部、区域性(locally)、吸入(例如,气溶胶吸入)、注射、输注、连续输注、直接浸润靶细胞的定位灌注、通过导管、通过灌洗、以乳剂、脂质组合物(例如脂质体)、或通过本领域普通技术人员已知的其他方法或前述的任意组合进行施用(例如,参见Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药典),第18版.Mack Printing Company,1990)。

[0150] 可将法图他汀A类似物或衍生物配制成游离碱、中性或盐形式的组合物。药用盐包括酸加成盐,例如与蛋白质性组合物的游离氨基形成的盐,或与无机酸,诸如例如盐酸或磷酸,或有机酸,例如醋酸、草酸、酒石酸或苦杏仁酸形成的盐。与游离羧基基团形成的盐可源自无机碱,诸如例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁;或有机碱,如异丙胺,三甲胺,组氨酸或普鲁卡因。配制后,将溶液以与剂型相容的方式和治疗有效量进行给药。制剂可容易地以各种剂型进行给药,例如配制用于胃肠外给药,例如可注射溶液,或递送至肺的气溶胶,或配制用于消化给药,例如药物释放胶囊等。

[0151] 进一步地,根据本发明,适用于给药的本发明的组合物提供在含或不含惰性稀释剂的药用载体中。载体应可同化,并且包括液体、半固体(即糊剂)或固体载体。目前除了对接受者或其中所包含的组合物的治疗效果有害的任何常规介质、试剂、稀释剂或载体之外,其用于实施本发明方法的给药组合物的应用是合适的。载体或稀释剂的例子包括:脂肪、油、水、盐溶液、脂质、脂质体、树脂、粘合剂、填充剂等,或其组合。组合物还可包含各种抗氧化剂以延缓一种或多种组分的氧化。此外,可以通过防腐剂防止微生物的作用,诸如,多种抗细菌剂和抗真菌剂,其包括但不限于,对羟基苯甲酸酯类(如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合。根据本发明,以任何常规和实际方式将组合物与载体组合,例如通过溶液、混悬液、乳化、混合、包封、吸收等方式。这些方法是本领域技术人员已知的。

[0152] 在本发明的一个具体实施方案中,将组合物与半固体或固体载体充分组合或混合。混合可以任何常规方式进行,例如研磨。混合过程中也可加入稳定剂以保护组合物避免治疗活性损失,即在胃中变性。组合物中可使用的稳定剂的例子包括:缓冲液、氨基酸如甘氨酸和赖氨酸、糖如右旋糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨糖醇、甘露醇等。

[0153] 在其他实施方案中,本发明可以考虑使用包含法图他汀A类似物或衍生物、一种或多种脂质和水性溶剂的药物脂质赋形剂组合物。如本文所用,术语“脂质”定义为包括在水中特征性不溶并且可用有机溶剂提取的广泛物质中的任一种。该广泛类型的化合物是本领域技术人员所熟知的,当在本文中使用术语“脂质”时,其不限于任何具体的结构。例子包括

含有长链脂肪烃的化合物及其衍生物。脂质可以是天然存在的或合成的(即人为设计或制备的)。然而,脂质通常是一种生物物质。生物脂质是本领域所熟知的,例如,包括中性脂肪、磷脂、磷酸甘油酯、类固醇、萜、溶血脂质、鞘糖脂、糖脂、硫脂(sulphatides)、含有醚和酯连接的脂肪酸的脂质和聚合脂质、以及它们的组合。

[0154] 本领域普通技术人员熟悉可以用于将组合物分散到脂质赋形剂中的技术范围。例如,法图他汀A类似物或衍生物可以通过本领域普通技术人员已知的任何方式分散到含脂质的溶液中,用脂质溶解,用脂质乳化,与脂质混合,与脂质组合,共价结合于脂质,作为悬浮液包含在脂质中,用胶束或脂质体包含或与胶束或脂质体复合,或者以其他方式与脂质或脂质结构结合。分散体可能导致或不导致脂质体的形成。

[0155] 给予动物病患的本发明的组合物的实际剂量可通过物理和生理学因素确定,例如体重、病况严重性、治疗疾病的类型、过去或并行的治疗干预手段、病患特发性以及给药途径。根据给药剂量和途径,优选的剂量和/或有效量的给药次数可根据受试者的响应而变化。

[0156] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含例如至少约0.1%的活性化合物。在其它实施方案中,活性化合物可以例如构成单位重量的约2%至约75%,或者约25%至约60%,以及其中可推导出的任意范围。当然,各治疗有效组合物中活性化合物的量可以以这样的方式制备,以使得在化合物的任何给定单位剂量中可获得适当剂量。诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、给药途径、产品储存期等因素以及其他药理学考量是制备所述药物制剂的领域中的技术人员所想到的,这样,需要多种剂量和治疗方案。

[0157] 在其他非限制性的例子中,每次给药的剂量也可以包含约1微克/kg/体重、约5微克/kg/体重、约10微克/kg/体重、约50微克/kg/体重、约100微克/kg/体重、约200微克/kg/体重、约350微克/kg/体重、约500微克/kg/体重、约1毫克/kg/体重、约5毫克/kg/体重、约10毫克/kg/体重、约50毫克/kg/体重、约100毫克/kg/体重、约200毫克/kg/体重、约350毫克/kg/体重、约500毫克/kg/体重、到约1000mg/kg/体重或更高,以及可推导出的任何范围。在从此处列出的数字推导出的范围的非限制性例子中,基于上述数字,可给予约5mg/kg/体重到约100mg/kg/体重、约5微克/kg/体重到约500毫克/kg/体重等的范围。

[0158] 消化组合物和制剂

[0159] 将法图他汀A类似物或衍生物配制成经消化途径给药。消化途径包括组合物与消化道直接接触的所有可能的给药途径。具体说,本文所公开的药物组合物可以口服、含服、经直肠或舌下给药。这样,这些组合物可用惰性稀释剂或用可同化的食用载体配制,或者它们可包封在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者它们可压制成片,或者它们可直接掺入饮食食物中。

[0160] 活性化合物可与赋形剂结合,并且可以可摄取片剂、口颊片、含片、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆剂、纸囊剂等形式使用(Mathiowitz等人,1997;Hwang等人,1998;美国专利号5,641,515;5,580,579;和5,792,451)。片剂、含片、丸剂、胶囊等也可包含下述:粘合剂,诸如例如黄芪树胶、阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶或其组合;赋形剂,诸如例如磷酸二钙、甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或其组合;崩解剂,诸如例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸或其组合;润滑剂,诸如例如硬脂酸镁;甜味剂,诸如例如蔗糖、乳糖、糖精或其组合;调味剂,诸如例如薄荷、冬青油、樱桃调味料、橘子调味料等。当单位剂型是胶囊时,除上

述类型的材料外,还可包含液体载体。各种其他材料可以包衣形式存在或另外改变剂量单位的物理形式。例如,可用虫胶、糖或两者对片剂、丸剂或胶囊进行包衣。当剂量形式是胶囊时,除上述类型的材料外,其还可包含载体,如液体载体。可对明胶胶囊、片剂或丸剂进行肠包衣。肠包衣防止组合物在pH为酸性的胃或肠道上部的变性。参见例如,美国专利号5,629,001。到达小肠时,其中的碱性pH溶解包衣,并且允许组合物释放并被特定细胞吸收,例如上皮肠细胞和派伊尔氏淋巴集结M细胞(Peyer's patch M cell)。酞剂糖浆剂可包含作为甜味剂的活性化合物蔗糖,作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和丙酯,染料和调味剂,例如樱桃或橘子调味料。当然,用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药学纯的并且在所用的量下基本上无毒。此外,活性化合物可结合到持续释放制剂和配方中。

[0161] 对于口服给药,本发明的组合物可备选地结合一种或多种赋形剂,以形成漱口剂、牙膏、口颊片、口服喷雾剂或舌下口服给药制剂。例如,可以将所需量的活性成分掺入合适的溶剂如硼酸钠溶液(多贝耳氏液(Dobell's Solution))中制备漱口剂。备选地,活性成分可以掺入口服溶液如含硼酸钠、甘油和碳酸氢钾的溶液中,或分散到牙膏中,或以治疗有效量加入可以包括水、粘合剂、磨料、调味剂、发泡剂和致湿剂的组合物中。备选地,可将组合物配制成可以置于舌下或以其他方式在口腔中溶解的片剂或溶液形式。

[0162] 适用于其他消化给药模式的其他制剂包括栓剂。栓剂是各种重量和形状的固体剂型,例如,通常插入直肠给药。插入后,栓剂在腔液中软化、融化或溶解。通常,对栓剂而言,传统的载体可包括,例如,聚亚烷基二醇、甘油三酯或其组合。在某些实施方案中,栓剂可以由包含例如约0.5%至约10%并且优选约1%至约2%活性成分的混合物形成。

[0163] 胃肠外组合物和制剂

[0164] 法图他汀A类似物或衍生物可通过胃肠外途径给药。如本文所用,术语“胃肠外”包括绕过消化道的途径。具体说,本文公开的药物组合物的给药途径可以是,例如,但不限于:静脉内、真皮内、肌内、动脉内、鞘内、皮下或腹膜内美国专利号6,537,514,6,613,308,5,466,468,5,543,158;5,641,515;和5,399,363。

[0165] 可以在适当混合表面活性剂如羟丙基纤维素的水中制备作为游离碱或药理学上可接受的盐形式的活性化合物的溶液。也可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备分散体。在普通的存储和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。适用于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体以及临用配制无菌注射用溶液或分散体的无菌粉末(美国专利5,466,468)。在所有情况下,形式必须无菌,并且必须是在一定程度上是流体以容易注射。在制造和储存条件下,它必须是稳定的,必须能够对抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用而保存。载体可以是溶剂或分散介质,例如,包括水、乙醇、多元醇(即,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们合适的化合物、和/或植物油。例如,使用涂层如卵磷脂,对于分散体,通过维持所需的粒度,以及使用表面活性剂,可维持适当的流动性。防止微生物的作用可通过各种抗菌剂和抗真菌剂实现,例如,对羟基苯甲酸酯类、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在所述组合物中使用延迟吸收试剂如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0166] 对于以水溶液进行的胃肠外给药,例如,必要时溶液因该适当缓冲,并且用足够的盐水或葡萄糖先使液体稀释剂等渗。这些具体的水溶液尤其适于静脉内、肌内、皮下和腹膜内给药。关于此,可使用的无菌水性介质是本领域技术人员根据本发明的公开内容已知的。

例如,可将一个剂量溶解在1毫升等渗NaCl溶液中,并且加入到1000ml皮下输液流体中,或者在所建议的输注部位进行注射(参见例如,“Remington’s Pharmaceutical Sciences《雷明顿药典》”第15版,第1035-1038页和第1570-1580页)。根据所需治疗的受试者的状态,将需要对剂量进行一些改变。在任何事件中,负责给药的人将决定用于个体受试者的适当剂量。

[0167] 无菌注射用溶液通过下述制备:将所需量的活性化合物结合到适当的溶剂中,需要时结合有上述各种其他成分,然后过滤除菌。通常,分散体通过下述制备:将各种除菌的活性成分结合到含有基本分散介质和来自上述那些的所需的其他成分的无菌运载体中。在用于制备无菌注射用溶液的无菌粉末剂的情形中,优选的制备方法是真空干燥和冻干技术,产生活性剂以及来自其之前无菌过滤的溶液的任何其他所需成分的粉末。粉末组合物与含有或不含稳定剂的液体载体例如水或盐水溶液组合。

[0168] 可将活性化合物法图他汀A类似物或衍生物配制成经各种各样的途径给药,例如局部(即经皮)给药、粘膜给药(鼻内、阴道等)和/或吸入给药。局部给药的药物组合物可包括活性化合物,其被配制成用于用药涂敷,例如软膏、糊剂、乳膏或粉末。软膏包括所有局部涂敷的油脂、吸收剂、乳剂和基于水溶性的组合物,而乳膏和洗剂是仅包含乳剂基质的那些组合物。局部给药的药物可包含渗透增强剂以促进活性成分经皮肤的吸收。合适的渗透增强剂包括甘油,醇,烷基甲基亚砷,吡咯烷酮和luarocapram。用于局部涂敷的组合物的可能的基质包括:聚乙二醇,羊毛脂,冷霜和矿脂以及任何其他合适的吸收剂、乳剂或水溶性软膏基质。需要时,局部制剂可还包含乳化剂、胶凝剂和抗微生物防腐剂,以保存活性成分并提供均一的混合物。本发明的经皮给药也可以包括采用“贴片”。例如,贴片可以在一定的时间期间内以预定的速率和连续的方式提供一种或多种活性物质。

[0169] 药物组合物可通过滴眼剂、鼻内喷雾剂、吸入剂和/或其他气溶胶递送运载体递送。通过鼻气溶胶使组合物直接递送至肺的方法已在例如美国专利号5,756,353和5,804,212中描述。类似地,用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰-甘油化合物的药物递送(美国专利号5,725,871)也是药学领域众所周知的。以聚四氟乙烯载体基质的形式经粘膜递送药物在美国专利号5,780,045中描述。

[0170] 术语气溶胶指分散在液化或加压气体推进剂中的液体颗粒的细分固体的胶体系统。本发明用于吸入的典型的气溶胶由活性成分在液体推进剂中或在液体推进剂和适当溶剂的混合物中的混悬剂组成。合适的推进剂包括烃和烃醚。

[0171] 组合疗法

[0172] 为了提高本发明的组合物的有效性,可以向患有代谢病症的个体递送其他疗法。例如,除了另一种用于肥胖的疗法之外,还可以向肥胖个体施用本发明的组合物。例如,另外的肥胖疗法包括饮食疗法、物理疗法(运动)、药物治疗、手术和行为疗法。示例性的药物治疗包括例如:赛尼可奥利司他®(Xenical Orlistat®)、芬特明(Phentermine)和西布曲明(Sibutramine)(Meridia®)。示例性的手术包括例如吸脂和胃旁路术。

[0173] 对于患有糖尿病的个体,例如,示例性的另外的治疗用化合物包括以下一种或多种:艾可拓(Actos)(吡格列酮(pioglitazone));ACTOSPlus Met;亚莫利(Amaryl)(格列美脲(glimepiride));Avandaryl(文迪雅(Avandia)+格列美脲);文迪雅(Avandia)(罗格列酮(rosiglitazone));文达敏(Avandamet)(马来酸罗格列酮(rosiglitazone maleate)和盐

酸二甲双胍 (metformin hydrochloride)); Byetta; Duetact (盐酸吡格列酮 (pioglitazone HCl) 和格列美脲); 盖尔弗 (Galvus) (维格列汀 (Vildagliptin)); 格列吡嗪 (Glipizide) (磺酰脲 (Sulfonylurea)); 格华止 (Glucophage) (二甲双胍 (metformin)); 格列美脲 (Glimepiride); Glucovance (格列本脲 (glyburide) / 二甲双胍); 瑞易宁 (Glucotrol XL) (格列吡嗪延迟释放剂); 格列本脲 (Glyburide); Glyset (米格列醇 (miglitol)) 糖苷酶抑制剂; Januvia (磷酸西格列汀 (sitagliptin phosphate)); 格列吡嗪-二甲双胍制剂 (Metaglip) (格列吡嗪+二甲双胍); 二甲双胍-双胍 (Metformin-biguanide); Prandin (瑞格列奈 (repaglinide)); Precose (阿卡波糖 (acarbose)); Rezulin (曲格列酮 (troglitazone)); Starlix (那格列奈 (nateglinide))。其他糖尿病疗法包括改善饮食和运动。

[0174] 示例性的代谢病症治疗的测量

[0175] 在本发明的特定方面中, 给予个体一种或多种本发明的组合物, 并评估该个体的代谢病症的至少一种症状的改善。例如, 在代谢病症是肥胖的具体实施方案中, 可以确定用一种或多种本发明的组合物治疗期间和/或治疗后肥胖的改善。肥胖的改善可通过任何标准方式进行测量, 但在特定方面, 例如, 通过体重测量、体重指数 (BMI) 测量、和/或身体局部尺寸测量 (如腰围测量) 确定肥胖的改善。计算BMI的示例性方法包括: 一个人的体重 (以千克为单位) 除以他的身高 (以米为单位) 的平方 (体重[kg] 身高[m]²)。认为30以上的BMI是肥胖, 在25到29.9之间的BMI为超重。在本发明的其他方面, 在向糖尿病个体施用本发明的疗法后检测所述个体的改善。在一个具体实施方案中, 通过血液检测来监测糖尿病。例如, 血液检测可测定化学物质A1C。血糖越高, A1C水平将越高。在一些情形中, 测量胆固醇 (包括HDL和/或LDL胆固醇) 和/或甘油三酯, 诸如通过本领域中的标准方式。在具体情形中, 进行空腹脂蛋白分布谱 (fasting lipoprotein profile), 如通过本领域中的标准方式进行。

[0176] 本发明的试剂盒

[0177] 本文所述的任意组合物可以包含在试剂盒中。在非限制性例子中, 试剂盒包括适用于治疗和/或预防一种或多种代谢病症的组合物。在本发明的其它实施方案中, 试剂盒包括一种或多种用于从个体取样的器械。例如, 该器械可以是拭子 (诸如棉花拭子)、牙签、解剖刀、刮勺、注射器等中的一种或多种。在另一实施方案中, 试剂盒中提供有其他化合物, 例如用于治疗和/或预防代谢病症的其他化合物。例如, 试剂盒中提供的任何组合物可以在水性介质中或以冻干形式包装。试剂盒的容器通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器形式, 可将组分置于其中, 并且优选适当等分。当试剂盒中存在多于一种的组分时, 试剂盒通常还包括第二、第三或其他另外的容器, 这些额外的组分可分别置于其中。

[0178] 包括下面的实施例, 以阐述本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解, 下面的实施例中描述的技术代表了本发明人发现的在本发明的实施中运行良好的技术, 因而可以被认为构成其实施的优选模式。然而, 根据本发明的公开内容, 本领域技术人员应理解, 可对所公开的具体实施方案进行许多改变, 并且仍然获得类似或相似的结果而不背离本发明的精神和范围。

[0179] 实施例1

[0180] 法图他汀A降低SREBP-响应性基因的表达

[0181] 药物处理的和未处理的细胞的基因表达特征比较可以揭示受法图他汀A影响的特

定分子途径。用法图他汀A或仅DMSO处理DU145细胞,并将提取的mRNA样品通过Affimetrix DNA微阵列进行分析,定位(mapping)了33,000个基因(表1)。

[0182] 表1.微阵列结果中显示的受法图他汀A调节的已知或可能受SREBP控制的基因

[0183]

已知受SREBP控制的基因		
基因编号	减少的倍数	基因名称
NM_000527.2	0.574349	低密度脂蛋白受体(LDLR)
NM000859.1	0.5	3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶A还原酶(HMG CoA R)
NM 0002130.1	0.353553	3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶A合酶1 (HMG CoA S)
NM_001096.1	0.574349	ATP柠檬酸裂解酶
NM_000664.1	0.574349	乙酰-辅酶A羧化酶 α
NM_005063.1	0.574349	硬脂酰-CoA去饱和酶(SCD)
NM_002004.1	0.659754	法呢基焦磷酸合酶(farnesyl pyrophosphate syntlietase)
AK000162	0.535887	乙酰-CoA合酶
NM_000431.1	0.5	甲基戊酸激酶(me valonate kinase, MVK)
NM002461.1	0.329877	甲基戊酸脱羧酶(MVD)

[0184]

NM_003129.2	0.5	鲨烯环氧酶
与甾醇/脂肪合成相关的基因		
基因编号	减少的倍数	
NM_022977.1	0.707107	脂肪酸-辅酶A连接酶长链4
NM_004457.2	0.707107	脂肪酸-辅酶A连接酶长链3
NM005931.1	0.659754	脂肪酸去饱和酶1
NM0019312	0.659754	二氢硫辛酰胺S-乙酰转移酶
AF167438	0.659754	智人(Homo sapiens)雄激素-调节的短链脱氢酶还原酶(dehydrogenaseneductase)1
NM006579.1	0.615572	依莫帕米(emopamil)-结合蛋白(甾醇异构酶)
D63807.1	0.615572	羊毛甾醇合酶
BC000408.1	0.574349	乙酰-辅酶A乙酰转移酶2
NM_004462.1	0.535887	法呢基-二磷酸法呢基转移酶1
D85181.1	0.5	甾醇-C5-去饱和酶
NM_016371.1	0.466517	羟基类固醇(17-β)脱氢酶7
NM_005542.1	0.329877	胰岛素诱导基因1 (INSIG1)

[0185] 结果表明,被法图他汀A下调(<0.7倍)的基因中55%是已知或可能是由甾醇调控元件结合蛋白(SREBP)控制的,包括LDL受体、HMG-辅酶A还原酶和脂肪酸合酶(Horton等人,2003)。通过RT-PCR实验证实代表性的SREBP-响应性基因的下调(图1A-1B)。这些结果表明,法图他汀A是SREBP途径的选择性抑制剂。

[0186] 为了说明法图他汀A削弱SREBP的功能,在存在或不存在法图他汀A的情况下在HEK293细胞中测定内源性SREBP激活SREBP-响应性报道基因的转录的能力(图2A-2B)。法图他汀A以浓度依赖性方式降低报道基因的激活,其中荧光素酶的表达受甾醇调控元件的三个重复控制。相反,法图他汀A不能削弱SREBP-1的外源表达的成熟形式(氨基酸1-500)激活报道基因活性的能力(图2C)。这些结果表明,法图他汀A能选择性阻断细胞中SREBP的激活过程。

[0187] 实施例2

[0188] 法图他汀A阻断SREBP的蛋白水解激活

[0189] 为了检验法图他汀A是否影响SREBP的蛋白水解激活,用针对SREBP-1的NH₂端的抗体,通过蛋白质印迹分析用法图他汀A处理的DU145细胞的全细胞裂解物(图3A)。法图他汀A处理以剂量依赖性方式降低SREBP-1的68 KDa成熟形式的量,而125 KDa前体形式的量增加。对于SREBP-2使用针对其COOH端的抗体得到类似结果(图3B)。这些结果表明法图他汀A直接或间接削弱两种SREBP同种型的蛋白水解激活。

[0190] 抑制SREBP的蛋白水解激活将破坏SREBP的核转移。用针对SREBP-1的NH₂端的抗

体,通过免疫荧光显微术分析法图他汀A对SREBP-1亚细胞定位的影响。仅用DMSO处理细胞时,在无血清(无脂肪)的培养基中,SREBP-1几乎排他性地定位在核中(图3C-3E)。相反,用法图他汀A温育细胞时,核中SREBP-1的免疫荧光降低而在核外相应增加(图3F-3H),这表明法图他汀A抑制SREBP-1的核定位。

[0191] 实施例3

[0192] 通过敲低SREBP-1确认法图他汀表型

[0193] 法图他汀A在培养细胞中导致两种表型:(i) 3T3-L1细胞的胰岛素诱导的脂肪生成的抑制和(ii) DU145前列腺癌细胞的血清非依赖性生长的阻抑。第一种表型与下述结论完全一致:因为SREBP-1在脂肪生成中的已知作用,法图他汀A是SREBP-1的阻断剂(Tontonoz等人,1993)。为了证实在细胞培养条件下,通过转染SREBP-1特异性的小干扰RNA(siRNA)的表达载体来沉默3T3-L1细胞中的SREBP-1的表达(图4G),并且检测沉默对胰岛素诱导的脂肪生成的作用。正如预期,敲低SREBP-1表达完全阻断了3T3-L1细胞的油滴形成(图4D-4F,克隆1和2),而用空白载体(neo;图4A)转染的对照细胞表现出与亲本3T3-L1细胞(图4B)一样多的脂肪累积。这些结果表明,3T3-L1细胞中法图他汀A诱导的表型是通过抑制SREBP-1介导的。

[0194] 为了测试法图他汀A对SREBP-1的抑制是否介导DU145细胞的血清非依赖性生长的阻抑,类似地通过转染SREBP-1特异性siRNA的表达载体使DU145细胞中SREBP-1的表达沉默(图5B)。用空白载体(neo)转染的对照细胞在血清或IGF1的存在下生长,正如亲本DU145细胞那样。相反,SREBP-1的表达被沉默的敲低细胞(克隆1和2)表现出减少的血清非依赖性IGF1驱动的生长,而对其血清依赖性的生长影响极少(图5A)。

[0195] 血清非依赖性生长中对SREBP-1的需求可能是因为无血清培养基中外部脂肪源的缺乏。当血清中不存在外源性脂肪酸时,细胞需要合成脂肪酸和胆固醇(膜结构单元)以维持细胞生长。为了测试脂肪酸在细胞生长中的重要性,监测无脂肪血清培养基中SREBP-1敲低细胞的生长(图5A)。SREBP-1沉默损害无脂肪培养基中的细胞生长,程度与其在无血清含IGF1的培养基中的一样。这些结果表明,法图他汀A通过抑制SREBP-1阻断癌细胞的血清非依赖性生长。

[0196] 实施例4

[0197] 法图他汀A减轻小鼠体重、降低胆固醇和葡萄糖水平并下调脂肪生成酶

[0198] 法图他汀A的药物样化学结构促使发明人研究其抑制完整动物的肝脏中的SREBP-1的能力。检测在长时间禁食(48小时)继之以喂饲无脂肪高碳水化合物饮食又48小时的脂肪生成条件下,法图他汀A对肝SREBP-1的作用。从48小时禁食期的前一天开始,以30mg/kg/天对小鼠腹腔内注射法图他汀A,持续5天。禁食48小时后,相对于对照组,处理组体重减轻更多(6.12 ± 0.6 相对于 4.9 ± 0.3 克/小鼠; $p=0.01$) (图6A)。处理期间未观察到食物摄取减少或明显毒性(图6B)。有趣的是,重新喂饲无脂肪高碳水化合物饮食48小时后,法图他汀A处理的小鼠的血清中出现降低葡萄糖水平(110 ± 23 相对于 137 ± 14 mg/dl; $P=0.06$)和胆固醇(93 ± 20 相对于 120 ± 19 mg/dl; $P=0.12$)的趋势(图6C)。处理小鼠组中HDL和LDL均降低。然而,LDL水平的降低似乎更显著(16 ± 5 相对于 30 ± 6 mg/dl) (图6C)。

[0199] 通过蛋白质印迹检测肝脏提取物中SREBP-1的表达水平。与细胞培养物的结果一致,用法图他汀A处理的小鼠的肝脏提取物表现出减少量的SREBP-1的68KDa成熟形式和增

加量的125KDa前体形式(图6D)。处理后还测定脂肪酸合酶(FAS)的肝表达,脂肪酸合酶(FAS)是一种代表性的SREBP-1响应性脂肪生成酶(Boizard等人,1998)。肝脏提取物的蛋白质印迹分析表明,法图他汀A处理使FAS的表达水平降低多达30%(图6E)。与表达减少相一致,其在提取物中的酶活性也类似地降低。如对FAS观察到的(图6G),在肝脏提取物中也由SREBP-1调控的乙酰辅酶A羧化酶(ACC)的活性降低(图6F)。这些结果表明,与在培养的细胞中发现的那样,法图他汀A阻断了小鼠肝脏中SREBP-1的激活。

[0200] 较长时间的处理(2周)另一组喂饲正常饮食的小鼠导致体重减轻10%,而对照组的体重无变化(图7A-7B)。两组间食物摄取类似(处理的和对照小鼠分别为3.8和3.5g/小鼠/天)。与在禁食/重新喂饲无脂肪饮食下喂饲的小鼠的结果一致,喂饲正常饮食的小鼠在血中表现出显著较低的葡萄糖水平和较低甘油三酯(TG)和胆甾醇水平的趋势(图7C)。FAS活性及其蛋白质水平也降低约30%(图7D和7E)。

[0201] 实施例5

[0202] 本发明的重要意义

[0203] 已证明生物活性小分子是探索复杂细胞过程(包括代谢途径)的有价值的工具。脂质稳态和胰岛素作用的一种关键调控子是SREBP转录因子家族(Brown和Goldstein,1997)。调节SREBP功能的小分子可以用于治疗代谢疾病,并且可以用作进一步从分子水平上理解疾病的工具。基于细胞和动物的数据表明,法图他汀A通过下调核中成熟SREBP-1形式的量减少脂肪生成基因的表达。

[0204] 报道了激活SREBP-1和-2的小分子。这些降低LDL的分子通过刺激SREBP的蛋白水解激活而上调LDL受体的表达。虽然作用的分子机制尚未完全明了,但数据提示SCAP是该分子的主要靶点。与这些分子不同,法图他汀A抑制SREBP的激活并下调SREBP-响应性基因(包括LDL受体基因)的表达(表1)。

[0205] 法图他汀A的动物数据与细胞培养结果一致。在重新喂饲无脂肪饮食下用法图他汀A处理的小鼠的肝脏提取物中,具有显著更低水平的成熟SREBP-1形式和更高水平的前体形式。另一方面并且正如预期,在对照组的肝脏提取物中,成熟形式的水平高于前体形式(Horton等人,1998)。有趣的是,组合形式的总量似乎无变化,唯一的差异为核(成熟)和胞质形式(前体)间的分布。这些数据表明,法图他汀A可能不改变SREBP-1的表达水平,而是提高前体的切割过程,导致其量的降低以及成熟和活性形式的增加。通过使用SCAP缺陷型小鼠的实验已证明SREBP-1切割在脂肪合成中的重要性:在重新喂饲条件下,小鼠肝脏不能诱导ACC和FAS的表达(Liang等人,2002)。

[0206] 为了评价核SREBP-1水平降低的生理学重要意义,测定ACC和FAS的水平和活性。响应于法图他汀A处理,它们在肝脏提取物中的活性被下调。这些结果与SREBP-1作为脂肪酸合成途径调节子的作用相一致(Shimano,2000)。Shimano等人揭示,用高碳水化合物饮食饲养SREBP-1^{-/-}小鼠时不能诱导FAS和ACC的水平,这证实SREBP-1在调节脂肪生成酶的表达中的作用。

[0207] 与对照相比,法图他汀A处理的小鼠中的一种有趣的观察是体重和血糖的减少。体重减少可能是因为脂肪生成酶如ACC和FAS下调导致的较低的脂肪生成速率。此外,作为ACC的产物和肉毒碱棕榈酰转移酶的强效抑制剂,丙二酰辅酶A的减少可导致增加的脂肪酸氧化和脂肪燃烧。在一个具体的实施方案中,法图他汀A抑制SREBP-1切割下调脂肪生成酶,增

加脂肪酸氧化,减轻体重并增加胰岛素敏感性,从而导致葡萄糖降低。

[0208] 实施例6

[0209] 材料

[0210] 如所述制备去脂血清 (Goldstein等人,1983)。不含脂肪的FBS购自Fisher。兔抗-SREBP-1 (sc-8984) 和山羊抗-肌动蛋白 (sc-1616) 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology。小鼠抗-SREBP-2多克隆抗体和小鼠抗-FAS抗体获得自BD Biosciences。抗-山羊IgG HRP和抗-兔IgG HRP获得自Promega。含DAPI的ProLong Gold抗退色试剂获得自Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies。抗-兔IgG FITC获得自Chemicon International。地塞米松 (Dexamethasone, DEX) 和1-甲基-3-异丁基叶黄素 (MIX) 获得自Sigma。

[0211] 法图他汀A的制备

[0212] 搅拌的同时,将2-溴-4'-甲基苯乙酮 (1.22g, 5.70mmol) 和丙硫异烟胺 (1.03g, 5.70mmol) 在乙醇 (20ml) 中的混合物在70℃加热0.5小时,然后冷却至0℃。将形成的黄色沉淀过滤,用冷乙醇洗涤,干燥后得到黄色针状物的法图他汀A氢溴酸盐 (1.78g, 83%) : ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600MHz) d_{H} 8.88 (d, $J=6.2\text{Hz}$, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.46 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 8.36 (dd, $J=1.4, 6.2\text{Hz}$, 1H), 7.99 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.31 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 3.03 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.80 (m, 2H), 0.96 (t, $J=7.6$, 3H); 关于 $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{S}+\text{H}$ 计算的HRMS (FAB) 精确质量需要 m/z 295.1269, 观测值 m/z 295.1269。

[0213] 细胞培养

[0214] 在37℃、5% CO_2 下将DU145人雄激素非依赖性前列腺癌细胞 (ATCC) 保持在含有2mM L-谷氨酰胺、1.0mM丙酮酸钠、0.1mM非必需氨基酸和1.5g/L碳酸氢钠以及10%胎牛血清、100单位/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素的Eagle's极限必需培养基中。在37℃将3T3-L1成纤维细胞 (ATCC) 保持在含有5.5mM葡萄糖、10%胎牛血清、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素, 0.5mM谷氨酰胺和0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素B (fungizone) 的Dulbecco's改良的Eagle's培养基中。在37℃、5% CO_2 下将人胚肾293细胞 (ATCC) 保持在含有10%胎牛血清, 100单位/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素的Dulbecco's改良的Eagle's培养基中。

[0215] 寡核苷酸微阵列分析

[0216] 在1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IGF1的存在下,在无血清培养基中,用5mM法图他汀A或仅用DMSO处理DU145前列腺癌细胞6小时,将总RNA提取到TRI试剂 (Molecular Research Center) 中,并通过RNeasy Mini Kit (Qiagen) 进一步分离。在贝勒医学院微阵列核心机构 (Baylor College of Medicine Microarray Core Facility) 通过Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array分析纯化的mRNA,所述Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array由几乎45,000个探针组构成,所述探针组代表来源于约33,000个已证实的人类基因的超过39,000种转录物 (Affymetrix, Inc.)。

[0217] 荧光素酶报道子测定

[0218] 在第0天,将HEK293细胞以 5×10^3 /孔的密度一式三份铺板到96孔板上在含有10%胎牛血清、100单位/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素的Dulbecco's改良的Eagle's培养基中。第2天,通过使用Lipofectamine试剂 (Lipofectamine reagent) (Invitrogen) 用以下质粒瞬时共转染细胞: 0.4 $\mu\text{g}/\text{孔}$ pSRE-Luc (一种SRE-1驱动的荧光素酶报道子构建体) 和0.1 μ

g/孔b-gal报道子,其中β-gal的表达受到肌动蛋白启动子的控制,终体积为150mL。在37℃培养5小时后,用磷酸缓冲盐水洗涤细胞,然后在不存在或存在法图他汀A的条件下,在含有10%无脂质血清、100单位/μL青霉素和100μg/mL硫酸链霉素的100μL Dulbecco's改良的Eagle's培养基中进行培养。培养20小时后,用20μL 1x Reporter Lysis Buffer (Promega)裂解各孔中的细胞,将等分试样用于测定荧光素酶(10μL)和β-半乳糖苷酶(10μL)活性。对于荧光素酶测定,在Wallac 1420 ARV0sx多标记计数器(PerkinElmer)中检测光子产生,以每秒计数表示。对于β-半乳糖苷酶测定,37℃培养0.5小时后,通过微板读数仪(Tecan)在405nm波长处测定O-硝基苯基-β-D-半乳糖苷酶的水解。由β-半乳糖苷酶的活性(OD单位)对荧光素酶活性(每秒计数)进行标准化处理。对于SREBP-1c的N端成熟形式的过表达,将pCMV-SREBP-1c(1-436)与pSRE-Luc共转染。pSRE-Luc和pCMV-SREBP-1c(1-436)由J.L.Goldstein(University of Texas Southwestern Medical Center)提供。

[0219] RT-PCR实验

[0220] 从DU145细胞将总RNA提取到TRI试剂(Molecular Research Center)中并用RNeasy Mini Kit进行分离。采用Access RT-PCR System对RNA样品进行RT-PCR。RT-PCR反应液包含总RNA,1μM的各引物,0.2mM dNTP,1mM MgSO₄,AMV反转录酶(2单位)和Tf1 DNA聚合酶(2单位),终体积25μL。所用的引物对如下:对于低密度脂蛋白受体(LDLR)是5'-TCA GAC CGG GAC TGC TTG GAC GGC TCA GTC-3'(SEQ ID NO:1)和5'-CCA CTT AGG CAG TGG AAC TCG AAG GCC G-3'(SEQ ID NO:2);对于硬脂酰辅酶A去饱和酶(SCD)是5'-GCC TGC TTG ATA ATA TAT AAA C-3'(SEQ ID NO:3)和5'-CAC TTG AAT TGA GCT TTA G-3'(SEQ ID NO:4);对于ATP柠檬酸裂解酶(ACL)是5'-AAG AAA AAG TGT CAG ACA GCT GG-3'(SEQ ID NO:5)和5'-TGG ACT GAA GGG GTG TTA GC-3'(SEQ ID NO:6);对于3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMG CoA R)是5'-GCC CGA CAG TTC TGA ACT GGA ACA-3'(SEQ ID NO:7)和5'-GAA CCT GAG ACC TCT CTG AAA GAG-3'(SEQ ID NO:8);对于甲羟戊酸激酶(MVD)是5'-CTG CCT GAC TGC CTC AGC-3'(SEQ ID NO:9)和5'-ACC TCT CCT GAC ACC TGG G-3'(SEQ ID NO:10);对于胰岛素诱导基因1(INSIG1)是5'-AAG ACT TCA GGG TAA GTC ATC A-3'(SEQ ID NO:11)和5'-CGT GTA TAA TGG TGT CTA TCA G-3'(SEQ ID NO:12)。扩增条件如下:在94℃持续4分钟,1次循环,然后在94℃变性40秒,在50℃退火40秒,在68℃延伸2分钟,22次循环(对于SCD和HMG CoA R),在58℃退火,24次循环(对于LDLR和INSIG1),或者在60℃退火,24次循环(对于ATP柠檬酸裂解酶(ACL)),在55℃退火,30次循环(对于MVD)。通过琼脂糖凝胶分析扩增的DNA并用Scion-image(版本4.02)软件进行定量。

[0221] 蛋白质印迹

[0222] 将DU145前列腺癌细胞以2x 10⁵个细胞/孔的密度接种到6孔板中,在无血清MEM中在37℃培养过夜。然后在IGF1(1μg/mL)存在下,用DMSO或法图他汀A(1或5mM)处理细胞。培育6小时后,将细胞收集到PBS中并在SDS缓冲液中裂解。样品在10%SDS-PAGE凝胶上分离,并用兔抗-SREBP-1和抗-SREBP-2抗体产生印迹。用增强的化学发光(ECL)检测试剂(Amersham)显现特定的条带。

[0223] 免疫荧光实验

[0224] 将DU145前列腺癌细胞接种到盖玻片上,在无血清MEM中过夜,然后用在含有IGF1(1μg/mL)的无血清MEM中的5mM法图他汀A或仅DMSO处理。培养6小时后,将细胞在-20℃在甲

醇中固定20分钟,并且在含有5%牛奶和0.1%吐温20的PBS中封闭1小时。将样品与兔多克隆抗-SREBP-1 (Santa Cruz:sc-8984) 一起孵育,然后与荧光素异硫氰酸酯缀合的抗-兔IgG抗体 (Chemicon Inc) 一起孵育。利用适用于荧光检测的滤波片,以 $\times 400$ 的放大倍数在Nikon TE200荧光显微镜下对盖玻片进行可视化。

[0225] SREBP的siRNA敲低

[0226] 在pSUPER载体 (OligoEngine) 中插入源自SREBP-1基因的序列 (512-531) 的互补寡核苷酸:5'-GAT CCC CGC CAC ATT GAG CTC CTC TCT TCA AGA GAG AGA GGA GCT CAA TGT GGC TTT TTG GAAA-3' (SEQ ID NO:13), 和5'-AGC TTT TCC AAA AAG CCA CAT TGA GCT CCT CTC TCT CTT GAA GGA GGA GCT CAA TGT GGC GGG-3' (SEQ ID NO:14)。用Fugene 6 (Roche) 将所得到的质粒转染到3T3-L1或DU145细胞中。为建立稳定转染的克隆,使用浓度为500 μ g/mL的新霉素衍生物G418 (Gibco), 并建立稳定的转化体。通过蛋白质印迹评价SREBP-1的表达水平。对于脂肪生成实验,将3T3-L1细胞接种到96孔板中,在含有10%胎牛血清的DMEM中,并且再培养2天至完全汇合。第0天,将培养基转换成诱导培养基:含10%胎牛血清、5 μ g/mL胰岛素、0.5mM 1-甲基-3-异丁基叶黄素 (MIX) 和1 μ M地塞米松 (DEX) 的DMEM。第2天,去除诱导培养基,并更换成含有10%胎牛血清和5 μ g/mL胰岛素的DMEM培养基。第10天,用Oil-Red O对脂肪油滴进行染色。对于细胞生长实验,将DU145细胞以2,000个细胞/孔的密度接种到96孔板上在无血清的或含1 μ g/mL IGF1、2%无脂胎牛血清或2%胎牛血清的MEM中。3天后通过WST-1测定评价细胞生长。该实验一式三份进行。

[0227] 利用法图他汀A的动物研究

[0228] 使雄性小鼠 (129Sv背景) 在贝勒医学院动物护理中心 (Animal Care Center at Baylor College of Medicine) 的受控条件下 (12小时光/暗循环;25 $^{\circ}$ C) 居住,其可随意接近标准实验室饲料 (Purina Mills) 和水。采用两种不同的方案对5-6月龄的雄性小鼠 (129Sv背景) 腹膜内施用法图他汀A (30mg/kg;150 μ L)。第一种方案包括:将小鼠禁食48小时,然后重新喂饲无脂饮食又48小时。除SREBP外,该处理还能诱导脂肪生成酶如ACC和FAS的活性和水平。在禁食前24小时开始施用法图他汀A或在PBS中的10%DMSO至对照组 (n=5), 并继续每天施用直到实验结束。

[0229] 在第二种方案中,用在PBS中的30mg/kg法图他汀A或10%DMSO每天处理两组雄性小鼠 (n=5), 持续2周。每天测定食物摄取和体重。在实验结束时,小鼠短暂禁食4-5小时,对它们进行取血以检测血清成分。然后处死小鼠,将它们的肝脏快速取出并在液氮中研磨成粉末。将粉末化的组织悬浮在含有0.1mM PMSF、5mM苯甲脒和5mg/mL蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 的10mL PBS中,用Polytron (3x30秒,高速) 匀浆化,并且进行短暂的超声处理以降解DNA。通过在16,000xg离心20分钟使提取物澄清。然后用商购的针对FAS和SREBP-1的抗体对样品进行蛋白质印迹分析。如之前所述的那样测定FAS和ACC活性 (Mao等人,2006)。

[0230] 实施例7

[0231] 在ob/ob小鼠中,法图他汀A预防脂肪肝、减轻高血糖症并引起体重减轻

[0232] 尽管努力探索调节食物摄取和能量平衡的网络,仍未完全了解肥胖是如何导致这些疾病的。研究法图他汀A对雄性ob小鼠的作用,尤其是其通过减少白色脂肪尺寸以防止体重增加、糖尿病病况和脂肪肝的作用。如之前提及的,法图他汀A是转录主控制的抑制剂,其是通过抑制SREBP-1的作用。用法图他汀A处理的正常小鼠体重减轻,并且具有较低的葡萄

糖和胆甾醇水平。与对照相比,法图他汀A减少处理的小鼠的肝脏中的活性成熟形式的SREBP-1。

[0233] SREBP-1和-2在脂肪酸和胆甾醇的生物合成中发挥相关但不同的作用。SREBP-1优先激活脂肪酸合成所需的基因,而SREBP-2有利于胆甾醇生成。由于法图他汀A阻断SREBP-1和可能的SREBP-2的激活,给肥胖ob/ob小鼠施用法图他汀A瞬时调节脂肪酸和胆甾醇的生物合成并且揭示了肥胖小鼠中有趣的表型。

[0234] 法图他汀A对体重和食物摄取的影响

[0235] 研究采用4-5周龄的雄性ob/ob小鼠,其平均体重为约23g/小鼠。每天腹膜内递送法图他汀A(30mg/kg/天),并且测量体重和食物摄取。如图8A-8B所示,处理的小鼠体重的增加显著低于对照。在第一周处理结束时,注射DMSO的ob对照小鼠增加平均4.82g/小鼠(从 23.58 ± 0.62 到 28.40 ± 1.45),而法图他汀处理组增加约为3.37g/小鼠(从 23.08 ± 1.53 到 26.45 ± 1.2 g/小鼠),($p=0.03$)。处理28天后,法图他汀A处理组体重比对照轻约12%(32.1 ± 1.4 对于法图他汀的 36.2 ± 2.2 g/小鼠)($P=0.02$)。两组中的累积食物摄取相似(图8C)。平均来说,在处理组中,食物摄取与对照没有显著性差异,分别地, 5.4 ± 1.5 相比于 5.9 ± 1.4 g/小鼠·天。

[0236] 法图他汀A对血中葡萄糖和脂质特征的影响

[0237] ob/ob小鼠中最独特的表型之一是胰岛素抵抗病症所导致的高血糖症。为了测定法图他汀A对血糖和脂质的影响,在标准饮食饲养的ob/ob小鼠中分析葡萄糖、甘油三酯和胆甾醇的血清水平。

[0238] 如图9A-9H所示,禁食过夜后,经处理的动物血清中的葡萄糖水平比对照低约70%;分别为 153.2 ± 30.5 和 429.4 ± 87 mg/dl ($P=0.003$)。经处理的动物血清中的葡萄糖水平变得与具有功能性ob基因的野生型小鼠相当,而给予DMSO的对照小鼠正如预期血糖过高。有趣的是,与对照相比,在经处理的动物中酮体(ketone bodies)(β -羟基丁酸酯)增加约7倍;分别为 3.62 ± 1.41 和 0.5 ± 0.37 mg/dl ($P=0.004$)。法图他汀A动物中酮体的高水平说明肝脏中脂肪酸氧化显著增加,所述氧化中的主要产物是分泌到血液中的酮体。并且,经处理的小鼠中增加的血液成分是血清中测定的未酯化的游离脂肪酸(NEFA),其比对照高约70%;分别为 1.93 ± 0.26 和 0.7 ± 0.2 mEq/l ($P=0.028$)。NEFA水平的这种增加可能是因为对脂肪酸氧化需求的增加导致的来自脂肪组织的脂解作用增加。已知在动物和人类中FFA与胰岛素抵抗有关。然而,虽然在法图他汀A处理的ob/ob小鼠的血清中FFA水平提高,但葡萄糖水平显著低于对照,这表明胰岛素敏感性的改善,这可能是因为改善的胰岛素信号传导所致。此外,近来发现,由于突变体乙酰辅酶A羧化酶小鼠($Acc2^{-/-}$ 突变体小鼠)的小鼠组织(肝、脂肪和肌肉)中脂肪酸氧化增加,导致由脂肪细胞中增加的脂解作用所致的血液中较高的酮体和增加的NEFA。与对照相比,经处理的小鼠血清中的甘油三酯(TG)水平提高约30%,分别为 115 ± 11 和 79 ± 12 ($P=0.006$),这表明法图他汀A提高TG自肝脏的分泌和迁移。总胆甾醇的血清水平在法图他汀处理动物中表现为较低趋势, 183 ± 16 相比于 219 ± 18 mg/dl ($P=0.06$)。然而,LDL显著降低约35%(31 ± 3 相比于 48 ± 8 ; $P=0.02$),而HDL降低较少,约为22%(144 ± 11 和 183 ± 12 ; $P=0.02$)。由于在法图他汀A处理的小鼠的血清中,LDL水平比HDL下降更多,这表明用法图他汀A处理的所需的结果。基于TG水平计算转运甘油三酯、磷脂和胆甾醇的VLDL的水平,增加约50%(23.1 ± 2.3 相比于 15.8 ± 2.4 mg/dl)。

[0239] 法图他汀A减小附睾脂肪大小并改善脂肪肝

[0240] 由于不受控制的食物摄取, ob/ob小鼠变成病态肥胖, 并且在脂肪组织和不同器官如肝中蓄积了过高的脂肪水平, 导致非酒精性脂肪肝病况和胰岛素抵抗。在约8-9周龄时, 与用法图他汀A处理的那些小鼠相比, 对照未处理小鼠显示变大的肝脏尺寸和蓄积的脂肪, 如苍白颜色所显示的 (图10A)。法图他汀A处理的小鼠肝脏的平均重量比对照少约32% (1.59 ± 0.2 相对于 2.34 ± 0.15 ; $P=0.06$) (图10D)。用油红染色脂滴的对照小鼠肝脏切片包含丰富的脂滴, 而法图他汀A处理的小鼠的那些切片没有脂滴, 脂滴主要是甘油三酯 (图10B)。已表明, 过表达SREBP 1的转基因小鼠发生脂肪肝。然而, 在缺乏SREBP-1的ob/ob小鼠 ($lep^{ob/ob} \times Srebp\ 1^{-/-}$) 中, 脂肪肝病况得到显著改善, 这表明SREBP 1是ob/ob小鼠中脂肪肝发展的主要作用因素。

[0241] 法图他汀A处理4周结束时, 处理的小鼠体重比对照轻。通过测定作为主要白色脂肪组织的附睾脂肪垫发现法图他汀A处理的小鼠具有显著更小的脂肪垫 (图10C)。脂肪垫的平均重量比对照少约20% (2.7 ± 0.1 相对于 3.6 ± 0.2 ; $P=0.02$) (图10D)。较小的脂肪垫可能是因为脂质储量减少和/或脂肪生成减少和脂肪中脂肪酸氧化增加。之前使用Acc2^{-/-}突变体小鼠的研究表明, 缺乏ACC2也导致肝脏中较少的脂肪、较小的附睾脂肪垫和包括肝脏在内的不同组织中增加的脂肪酸氧化。在这里指出, 由于缺乏ACC2产生的丙二酰辅酶A对肉毒碱棕榈酰转移酶的抑制, 脂肪酸氧化增加, 小鼠变得高度胰岛素敏感并避免饮食诱导的肥胖和糖尿病。在具体的方面, 法图他汀A下调ACC酶增加脂肪酸氧化并抑制不同组织 (诸如, 例如肝脏、脂肪和肌肉) 中的脂肪酸合成。测定法图他汀A处理的ob/ob小鼠肝脏中的TG和胆甾醇水平, 并与ob/b对照进行比较。如图11A所示, 处理的小鼠肝脏中的TG水平下降约65% (分别为 14.8 ± 3.7 和 38.7 ± 6.0 mg/克肝脏; $P=0.0004$)。法图他汀A还能使肝脏中的胆甾醇水平下降超过20% (2.8 ± 0.5 和 3.6 ± 0.1 ; $P=0.03$) (图11B)。这些结果进一步证实了Oil Red O染色, 并且表明, 部分地由肝脂肪生成增加引起的ob/ob小鼠中的脂肪肝可通过法图他汀A治疗完全防止。处理的ob/ob小鼠肝脏中这些脂质的下降是因为合成TG和胆甾醇或其前体所需的脂肪生成酶的显著抑制。此外, 由于不同小鼠组织 (包括肝脏) 对脂肪酸氧化需求的提高, 脂肪酶肝脏活性提高, 并且还增加这些脂质从肝脏转移到循环中, 以被不同的脂肪酸氧化组织 (如心脏和肌肉) 利用。在具体的方面, 这与法图他汀A处理的ob/ob小鼠血中较高水平的TG有关。

[0242] 法图他汀A下调ob/b小鼠肝脏中的脂肪生成酶

[0243] 脂肪生成途径中的酶受到转录因子如PPAR和SREBP调节。检验在经处理的ob/ob小鼠中法图他汀A对脂肪生成酶水平和活性的影响。测定执行脂肪酸合成中的限速步骤的乙酰辅酶A羧化酶 (ACC) 的活性。ACC催化乙酰辅酶A的羧化而产生丙二酰辅酶A (脂肪酸合成中的结构单元), 而脂肪酸的合成由另一种多功能酶脂肪酸合酶 (FAS) 执行。丙二酰辅酶A除了在脂肪酸合成中起作用之外, 还通过抑制肉毒碱棕榈酰转移酶1 (CPT 1) 而在脂肪酸氧化中发挥重要作用。脂肪生成酶在ob/ob小鼠中被显著诱导, 部分地解释了这些小鼠的病态肥胖表型。法图他汀A处理的小鼠的肝脏提取物中的ACC的活性下降约40% (3.44 ± 0.44 相对于 5.55 ± 0.57 n mol/min.mg) (图12A)。在法图他汀A处理的ob/ob小鼠的肝脏提取物中, 脂肪酸合酶活性也被显著下调。在经处理的小鼠中FAS活性下降超过70% (8.64 ± 1.91 相对于 22.6 ± 1.37 n mol/min.mg) (图12B)。ACC和FAS活性的下降都是由于两种酶表达水平的下

降,如两种酶的蛋白质印迹分析所示(图12C)。其产物脂肪酸,C14:0和C16:0,在法图他汀处理的ob/ob小鼠的肝脏中比在未处理的对照小鼠的肝脏中显著更低(约50%)(表2)。

[0244] ACC受到磷酸化/去磷酸化机制的急性调节,分别导致酶的抑制和活化。如图12C所示,对照组中磷-ACC的水平较高,然而因为ACC的表达水平同样较高且达到相同的程度,这说明法图他汀A没有改变特定的磷酸化水平(P-ACC/ACC蛋白)。这些结果表明,ACC活性的下调仅仅是因为酶水平下降,而不是磷酸化状态的下降(图12C-12D)。之前表明,肝脏中存在两种ACC同种型;ACC1(肝脏中的优势同种型)和ACC2(肌肉中的优势同种型),它们分别在调节脂质合成和氧化中发挥不同作用。ACC和FAS活性的下降表明脂肪生成减少,而在法图他汀A处理的小鼠的肝脏中脂肪燃烧显著提高,这与如图9A-9H所示的法图他汀A处理的ob/ob小鼠的血液中酮体的7倍增加一致。测定也在SREBP-1、ATP柠檬酸裂解酶(ACL)和硬脂酰辅酶A去饱和酶1(SCD1)的转录调控下的脂肪酸代谢中的两种关键酶的水平。在法图他汀A小鼠的肝脏提取物中,使胞质柠檬酸盐转化为乙酰辅酶A的ACL的蛋白水平下降约70%,乙酰辅酶A是ACC用以产生用于脂肪酸合成的丙二酰辅酶A的底物。ACL水平的这种下调进一步扩大在脂肪生成组织如肝脏中法图他汀A对脂肪生成过程的减少的影响。SCD1通过在脂肪酰基辅酶A如棕榈酰-CoA和硬脂酰辅酶A的 $\Delta 9$ 位引入顺式双键催化单不饱和脂肪酸生物合成中的限速步骤。产物棕榈油酰辅酶A(16:1)和油酰辅酶A(18:1)是甘油三酯和胆甾醇酯的重要成分,并且,在包括ob/ob小鼠在内的小鼠中的SCD1的缺失导致代谢速率增加,肥胖减轻,防止脂肪肝并避免饮食诱发的糖尿病。如图12D所示,与对照相比,法图他汀A处理的小鼠的肝脏提取物中SCD1的蛋白水平下降约50%。这可通过以下结果证实:单不饱和脂肪酸C16:1、C18:1和C20:1下降约70%,并且其延长产物(C18:2)N-6、(C18:3)N-6、(C20:2)N-6和(C20:3)N-6的去饱和减少约50%(表2)。在本发明的具体实施方案中,这种对SCD1的减少的影响是体重减轻的重要因素,并且降低肝脏中的TG水平并避免脂肪肝。有趣的是,法图他汀A处理不改变FADS1或 $\Delta 5$ 去饱和酶的蛋白质水平。

[0245] 表2:OB/OB处理的小鼠和它们未处理的对照的肝脏中的脂肪酸的气相色谱-质谱(GC-MS)分析

[0246]

	法图他汀 A	对照		
脂肪酸	$\mu\text{mole/克肝脏}$	$\mu\text{mole/克肝脏}$	比率 处理的:对照	P 值
(14:0)	1224.567 ± 508.88	2378.586 ± 329.454	0.51483	0.047781
(16:0)	37143.23 ± 3656.16	85044.75 ± 5716.175	0.436749	0.001619
(18:0)	15067.14 ± 916.48	14129.2 ± 272.7029	1.066383	0.260833
(20:0)	164.3537 ± 22.89	192.9773 ± 16.46977	0.851674	0.059842
(22:0)	116.1305 ± 25.97	91.74762 ± 12.60782	1.26576	0.2499
(24:0)	157.8261 ± 7.02	120.6449 ± 19.37201	1.308188	0.052305
(16:1)	11429.29 ± 227.5	34787.26 ± 4482.311	0.328548	0.005542
(18:1)	44471.72 ± 8840.37	152218.4 ± 12872.57	0.292157	0.001621
(20:1)	593.7212 ± 119.68	1829.537 ± 230.8927	0.32452	0.00368
(22:1)	94.94588 ± 14.91	109.0117 ± 11.47413	0.870969	0.379216
(24:1)	397.92 ± 215.3	234.2073 ± 26.9417	1.699008	0.214302
(18:2)N-6	29673.93 ± 2456.22	46513.4 ± 2825.032	0.637965	0.00455
(18:3)N-6	237.1671 ± 40.5	560.4358 ± 61.89641	0.423183	0.00546
(20:2)N-6	426.6694 ± 63.52	914.0388 ± 90.59441	0.466796	0.001424
(20:3)N-6	1630.394 ± 193.18	2589.236 ± 154.791	0.629682	0.008568
(20:4)N-6	8747.289 ± 781.41	7772.095 ± 110.7878	1.125474	0.171108
(22:4)N-6	280.2708 ± 46.1	292.2569 ± 11.81504	0.958988	0.810355
(22:5)N-6	172.9715 ± 64.89	146.5646 ± 14.54166	1.180173	0.879433
(18:3)N-3	4416.975 ± 643.658	3625.879 ± 220.5747	1.21818	0.703923
(20:5)N-3	2145.643 ± 265.17	3067.856 ± 299.7701	0.699395	0.04467
(22:5)N-3	1720.424 ± 221.16	2338.451 ± 234.2185	0.735711	0.092988
(22:6)N-3	9223.38 ± 700.31	8718.014 ± 532.5817	1.057968	0.448218

[0247] 肝脏样品 (100mg) 从法图他汀A处理的ob/ob小鼠和未处理的对照小鼠获取,并且在 -80°C 储存直到进行脂肪酸含量分析。根据Folch的方案提取脂肪酸并用气相色谱-质谱(GC-MS)进行定量分析。如上表所示,脂肪酸从头合成产物C14:0和C16:0下降约50%,单不饱和脂肪酸C16:1、C18:1和C20:1及其延长去饱和产物(C18:2)N-6、(C18:3)N-6、(C20:2)N-6、(C20:3)N-6和(C20:5)N-3下降约70%。FAS的产物肉豆蔻酸酯(C14:0)和棕榈酸酯(C16:0)下降约50% ($P < 0.05$)。不仅来源于通过FAS的脂肪酸从头合成而且还来源于食物和链延长系统的C18水平没有变化。有趣的是,存在C20:0下降约15% ($P = 0.059$)而C24:0增加30% ($P = 0.05$)的强烈趋势。与长链饱和脂肪酸的显著减少平行,结果表明单不饱和脂肪酸C16:1、C18:1和C20:1的水平显著减少约70% ($P < 0.004$)。并且,多不饱和长链脂肪酸(18:2)N-6、(18:3)N-6、(20:2)N-6、(20:3)N-6和(20:5)N-3的水平下降30-60%。这些减少是由于脂肪生成途径中的关键酶(FAS, ACC和SCD, ACL)在转录和翻译水平上的下调。这些结果有助于解释法图他汀A在通过降低肝脏中制备的甘油三酯水平来改善脂肪肝病况中的效果。

[0248] 脂肪生成酶的mRNA水平的下调

[0249] 蛋白质水平下降可能归因于转录或翻译调控。除脂肪生成转录因子PPAR γ 外,实时PCR还可用于测定代表性的脂肪生成基因ACC1、FAS和SCD1的mRNA水平的水平。ACC1、FAS和SCD1的mRNA水平下降约80% (图13)。这些结果与较低的酶蛋白水平和活性相一致,并且

强烈提示法图他汀A通过抑制SREBP-1的成熟降低脂肪生成。在具体实施方案中,脂肪生成酶的下调涉及其主要转录因子之一,即PPAR γ 。在法图他汀A处理的小鼠的提取物中,该转录因子的mRNA水平下降约40% (图13)。由于用法图他汀A处理的ob/ob小鼠减轻了高血糖症且防止了脂肪肝,这提示,在具体的方面,肝脏中的PPAR γ 是可能影响这些病理学病症的几种因素中的一种。总之,在处理的ob/ob小鼠中,法图他汀A通过其对SREBP-1的作用通过减少肝TG储量改善脂肪肝,减轻肥胖并降低高血糖症。这些研究提示,法图他汀A及其类似物是有用的对抗例如肥胖、脂肪肝和糖尿病的药剂。

[0250] 使4-5周龄的纯合雄性肥胖 (ob/ob) 小鼠 (C57BL/6J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 居住在受控条件下 (12小时光/暗循环; 25°C)。每笼养5只小鼠, 并且在其到达后, 小鼠自由接近标准实验室饲料 (Purina Mills, Richmond IN) 和水, 持续一周。在实验第一天以及随后的每一天, 测定小鼠重量以及消耗的食物量。每天3-5p.m. 间测定小鼠重量和剩余的食物, 之后ip注射法图他汀A (30mg/kg; 150 μ L)。每天继续施用法图他汀A或在PBS中的10%DMSO至对照组 (n=5), 持续4周直到研究结束。

[0251] 每天注射法图他汀A 28天后, 将小鼠禁食过夜并取血, 并用Glucometer Precision Xtra (Abbott) 测量全血葡萄糖和 β -羟基丁酸酯。为了确定血清成分, 通过Comparative Pathology Laboratory (Baylor College of Medicine) 进行葡萄糖、甘油三酯和胆甾醇测量。通过使用NEFA C试剂盒 (Wako Chemicals, Richmond, VA) 测定血清非酯化脂肪酸 (NEFA)。

[0252] 处死小鼠并测定肝脏和附睾脂肪垫的重量。用Oil Red O染色来自各个动物的肝脏切片的冷冻切片以可视化肝脏切片中的脂肪滴 (TG), 如先前所述 (Abu-Elheiga等人, 2001)。剩余的肝脏组织冷冻到液氮中, 并在-80°C保存以备进一步分析。如参考文献中所述 (Chandler等人, 2003), 使用适用于以96孔板形式进行比色分析的Cholesterol E Kit (Wako) 和Infinity Triglyceride Kit (Thermo Electron, Melbourne, Australia) 进行肝脏甘油三酯和胆甾醇含量。

[0253] 酶活性和蛋白质印迹分析

[0254] 在液氮中将冷冻的肝脏部分研磨成粉末。将粉末化组织悬浮在含有0.1mM PMSF、5mM苯甲脒和5mg/ml蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 的10ml PBS中, 并用Polytron (3x30秒, 高速) 匀浆化, 并且进行短暂的超声处理以降解DNA。通过以16,000x g离心20分钟使提取物澄清。测定上清液中的蛋白质浓度, 并用针对以下酶的商购抗体进行蛋白质印迹分析: FAS (BD Biosciences)、柠檬酸裂解酶SCD1、FADS1、ACC和磷-ACC抗体。用Amersham ECL PlusTM蛋白质印迹检测试剂将蛋白质可视化。扫描目的蛋白的特定条带的强度并针对 β -肌动蛋白标准化进行定量。如之前所述测定来自肝脏提取物的FAS和ACC活性 (Mao等人, 2006)。

[0255] 定量实时PCR

[0256] 用TRIzol试剂 (Invitrogen) 从小鼠组织制备总RNA。将来自5只小鼠的等量RNA汇合, 并用DNA酶I (Turbo DNA-free, Ambion, Inc.) 处理。用Superscript II RNAase H-反转录酶 (Invitrogen) 利用随机六聚体引物从2 μ g的DNA酶I-处理的总RNA合成第一链cDNA。实时PCR在20 μ l的终体积中包含10ng反转录的总RNA、0.5 μ M正向和反向引物和10 μ l来自DyNamo HS SYBR Green qPCR试剂盒 (Finnzymes) 的2x主混合物。采用DNA Engine Opticon System (MJ Research, Inc), 在96孔板中进行PCR。所有反应一式三份进行, 并且用比较C(t)

法计算mRNA的相对量。用Opticon监测软件2.02 (MJ Research) 计算循环阈值C(t)。小鼠 β -肌动蛋白mRNA用作内部对照。数据表示为平均值 $\pm$ SD。用未配对的双尾Student t检验 (unpaired two-tailed Student t-test) 来评估两组间差异。

[0257] 实施例8

[0258] 法图他汀A及其类似物或衍生物的靶标分子的鉴定

[0259] 在本发明的某些方面,鉴定了法图他汀A或其类似物或衍生物的一个或多个靶标。虽然可采用任何合适的方法进行这种鉴定,但在具体的实施方式中,对法图他汀A或其类似物或衍生物进行标记。示例性的标记包括例如生物素。

[0260] 实施例9

[0261] 示例性的化合物及其修饰

[0262] 图14A-14F显示了本发明的示例性化合物,它们的给定名称提供在表3和表4中。图15-17显示了通过图2A所示的相同方法的针对20mM的这些示例性化合物的示例性荧光素酶报道基因测定。如所述进行脂肪生成测定 (Choi等人,2003)。将完全抑制细胞中油滴形成的类似物评分为脂肪生成抑制类似物。

[0263] 表3:本发明的示例性化合物

[0264]

名称	条目	Luc/Gal	STDEV	脂肪生成的抑制
	无	9.4426	1.0577	
2-丙基-4-(4-对甲苯基噻唑-2-基)吡啶	1	6.2297	1.1014	+
4-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	2	4.5130	0.6176	-
4-(4-苯基噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	3	7.4643	2.2215	-
4-(4-(4-氯苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	4	6.3808	2.0425	-
4-(4-(4-乙基苯基)噻唑-2-基)吡啶	5	7.6190	1.6221	-

[0265]

4-(4-对甲基噻唑-2-基)吡啶	6	13.4689	1.6735	-
4-(4-(4-甲氧基苯基)噻唑-2-基)吡啶	7	18.3174	2.9172	-
4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基苯甲酸酯	8	7.7585	1.6193	+
4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯酚	9	14.5234	2.7276	+
2-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯氧基)乙酸甲酯	10	10.7717	0.8662	-
4-(4-氯苯基)-2-(3,4-二甲氧基苯基)噻唑	12	5.9214	1.2693	-
4-(4-(3,4-二氯苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	13	5.2391	0.4021	-
4-(4-(4-氟苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	14	9.6605	0.9824	-
4-(4-(2,4-二氟苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	15	10.8383	1.7661	-
4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺	16	10.3338	2.0763	+
N-异丙基-4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺	17	4.7079	1.2781	+
N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)乙酰胺	18	11.7685	6.8358	+
	无	15.0759	0.8305	
2-丙基-4-(4-对甲基噻唑-2-基)吡啶	1	7.5537	0.9784	+
N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)甲烷磺酰胺	19	4.1981	0.4653	+
N-苄基-4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺	20	5.6748	0.0613	+
N-(环丙基甲基)-4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺	21	6.4378	1.2736	+
4-(4-溴苯基)-2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-5-甲酸	22	21.5911	0.8383	-
4-(4-溴苯基)-2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-5-甲酸甲酯	23	8.1137	2.5369	+
4-(4-(4-甲氧基苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	24	11.0367	2.1112	-
4-(4-(3-甲氧基苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	25	7.8536	1.2799	-
4-(4-(2-甲氧基苯基)噻唑-2-基)-2-丙基吡啶	26	8.3046	2.6780	+
2-苯基-4-对甲基噻唑	27	13.8222	1.3938	-
3-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯酚	28	12.7791	1.1429	-
2-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯酚	29	8.2379	1.9501	-

[0266]

4-(4-溴苯基)-N-异丙基-2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-5-甲酰胺	30	16.0226	2.1917	-
4-(4-(4-氯苯基)噻唑-2-基)吡啶	31	16.9971	2.6512	-
4-(4-(4-氯苯基)噻唑-2-基)-2-乙基吡啶	32	9.5798	0.8524	-
4-(4-氯苯基)-2-苯基噻唑	33	17.8175	3.7158	-
2-丙基-4-(4-(噻吩-2-基)噻唑-2-基)吡啶	34	12.1593	1.5587	+
2-苯基-4-对甲苯基噻唑	27	13.8222	1.3938	-
	无	18	2	
2-丙基-4-(4-对甲苯基噻唑-2-基)吡啶	1	9.41384 5	0.84065 1	+
4-(4'-甲基[1,1'-二苯基]-4-基)-2-丙基吡啶	35	11.3586 6	0.88147 5	+
2-(2-丙基吡啶-4-基)-4-对甲苯基噻唑-5-甲酸	36	18.9888 9	2.08209 3	
2-乙基-4-(4-对甲苯基噻唑-2-基)吡啶	37	9.86990 6	0.71108	
4-苯基-2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-5-甲酸	38	22.6581 1	3.89866 7	
2-(2-丙基吡啶-4-基)-4-对甲苯基噻唑-5-甲酸甲酯	39	14.9297 8	2.60044 3	
	无	8.2181	0.5097	
2-丙基-4-(4-对甲苯基噻唑-2-基)吡啶	1	3.4437	0.2720	
4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基氨基甲酸叔丁酯	40	2.4390	0.4730	
N-环己基-4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺	41	6.5229	0.8638	
4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)-N-甲苯磺酰基苯胺	42	3.3957	0.3619	
N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)-8-喹啉磺酰胺	43	2.8506	0.6396	
N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)-2-噻吩磺酰胺	44	1.8538	0.1240	

[0267] 表4

[0268]

名称	化合物
4-(4-溴苯基)-2-(吡咯烷-2-基)噻唑	45
4-(4-溴苯基)-2-(1-丙基吡咯烷-2-基)噻唑	46

[0269]

2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯	47
2-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯	48
3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)-1-丙基哌啶	49
3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯	50
3-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯	51
4-(4-(4-溴苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯	52
(R)-2-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯	53
3-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯	54
4-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)哌啶-1-甲酸苄酯	55
4-(3-(吡啶-2-基)-[1,2,4]三唑并[4,3-b]哒嗪-6-基)-N-甲苯磺酰基苯胺	56
3-氯-4-甲基-N-(6-(4-(3-(三氟甲基)苄基)哌嗪-1-基)吡啶-3-基)苯磺酰胺	57
(4-(5-氯-2-甲基苯基)哌嗪-1-基)(4-(甲苯磺酰基氨基)苯基)甲酮	58
4-(4-((1-甲基-1 <i>H</i> -苯并[<i>d</i>]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)-N-甲苯磺酰基苯胺	59
4-氯-N-(4-(4-((1-甲基-1 <i>H</i> -苯并[<i>d</i>]咪唑-2-基)甲基)哌嗪-1-基)苯基)苯磺酰胺	60
(Z)-4-(3-氰基-3-(4-(2,4-二甲基苯基)噻唑-2-基)烯丙基)-N-(噻唑-2-基)苯磺酰胺	61
N-(3-(<i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]吡啶-2-基)苯基)-4-甲基-2-苯基噻唑-5-甲酰胺	62
N-(3-(苯并[<i>d</i>]噻唑-2-基)苯基)异烟酰胺	63
3-(4-氯苯基)-4,5-二氢-1-苯基-5-(2-苯基噻唑-4-基)-1 <i>H</i> -吡唑	64
N-(4-(6-甲基苯并[<i>d</i>]噻唑-2-基)苯基)-2-(<i>N</i> - <i>间</i> -甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺	65
N-(4-(6-甲基苯并[<i>d</i>]噻唑-2-基)苯基)-2-(<i>N</i> - <i>对</i> 甲苯基甲基磺酰胺基)乙酰胺	66

[0270] 而且,技术人员理解,适合修饰示例性化合物的一个或多个方面以助于鉴定其他合适的化合物。例如,当确定特定化合物对于一种或多种代谢病症的治疗和/或预防的适当性时,可以修饰该化合物以鉴定用于相同或不同代谢病症的其他相关的化合物。在具体的实施方案中,这些改变可根据本文所述示例性的化学基团进行。

[0271] 实施例10

[0272] 通过抑制SREBP激活阻断脂肪合成

[0273] 细胞中脂肪消耗后,甾醇调控元件结合蛋白(SREBP)由膜蛋白水解释放而转移到核中,在核中它们激活参与胆甾醇和脂肪酸生物合成的基因的转录。在本发明中,证明了阻断脂肪生成的小合成分子是SREBP激活的选择性抑制剂。被称为法图他汀的二芳基噻唑衍生物削弱SREBP的蛋白水解激活,从而降低细胞中脂肪生成基因的转录。法图他汀的分子靶标似乎是SREBP切割激活蛋白(SCAP)。法图他汀阻断肥胖ob/ob小鼠中体重增加、血糖和肝脂蓄积的增加,甚至在不受控制的食物摄取条件下也如此。

[0274] 如本文所述,法图他汀抑制3T3-L1细胞的胰岛素诱导的脂肪生成以及DU145细胞的血清非依赖性生长(Choi等人,2003)。比较经药物处理和未处理细胞的基因表达特征以获取关于受法图他汀影响的特定分子途径的信息。用法图他汀或仅DMSO处理DU145细胞,并且通过定位了33,000个基因的Affymetrix DNA微阵列分析提取的mRNA样品。在这些基因中(所有都可从万维网上的National Center for Biotechnology Information的GenBank数据库获得),响应于法图他汀处理,63种基因的转录水平下降至少35%(表5)。受影响的基因中的34种与脂肪或甾醇合成直接相关,如编码生物合成酶的基因,并且已报道受影响的基因中的18种受SREBP控制(Horton等人,2003)。受影响的SREBP-响应性基因的下调通过RT-PCR实验得到证实。下调基因的列表中的SREBP响应性基因和脂肪/胆甾醇生物合成基因的高发生率暗示法图他汀作用于SREBP途径。表5显示微阵列分析的结果。已报道18种下划线显示的基因受SREBP控制,粗体显示的基因与脂肪或甾醇合成相关。

[0275] 表5

[0276]

P	D	0.707107	Hs.17414	NM_00109	<u>ATP 柠檬酸裂解酶</u> <u>/FL=gb:NM_001096.1</u>
P	D	0.707107	Hs.11223	NM_00589	异柠檬酸脱氢酶 1 (NADP+), 可溶的 <u>/FL=gb:AF020038.1 gb:AF113917</u>

[0277]

P	D	0.707107	Hs.268012	D89053.1	脂肪酸-辅酶A连接酶,长链 3/FL=gb:NM_004457.2 gbz:D89053.1 gb:AF116690.1
P	D	0.707107	Hs.155976	Al670819	滞蛋白 (Cullin) 4B/FL=gb:NM_003588.1 gb:AB014595.1
P	D	0.707107	Hs.41693	BG252490	DNAJ (Hsp40)同系物,亚家族 B,成员 4/FL=gb:U40992.2 gb:NM_007034.2
P	D	0.707107	Hs.14732	AL049699	苹果酸酶 1, NADP(+)-依赖性的,胞质中/FL=gb:NM_002395.2
P	D	0.707107	Hs.213289	S70123.1	低密度脂蛋白受体(家族性高胆固醇血症)
P	D	0.707107	Hs.6986	AL565516	人葡萄糖转运蛋白假基因
P	D	0.659754	Hs.75616	NM_014676	scldin-1/FL=gb:AF261758.1 gb:BC004375.1 gb:NM_014762.1
P	D	0.659754	Hs.77393	NM_00200	法尼基二磷酸合酶(法尼基焦磷酸合酶, 二甲基烯丙基反式转移酶(transtransferase), 香叶基反式转移酶
P	D	0.659754	Hs.132898	NM_00593	脂肪酸去饱和酶 1
P	D	0.659754	Hs.274398	BC002654	智人, 与微管蛋白相似, $\beta 4$, 克隆 MGC:4083, mRNA, 完整 cds
P	D	0.659754		BC005838	智人, 微管蛋白, beta5
P	D	0.659754	Hs.115285	BF978872	二氢硫辛酰胺 S-乙酰基转移酶(丙酮酸脱氢酶复合物的 E2 组分)
P	D	0.659754	Hs.159154	AL565749	微管蛋白, $\beta 4$
P	D	0.659754	Hs.179817	AF167438	智人雄激素-调节的短链脱氢酶还原酶 1 (ARSDR1)
P	D	0.615572	Hs.213289	NM_00052	低密度脂蛋白受体(家族性高胆固醇血症)/FL=gb:NM_000527.2
P	D	0.615572	Hs.75105	NM_00657	依莫帕米-结合蛋白(甾醇异构酶)/FL=gb:NM_006579.1
P	D	0.615572	Hs.74304	NM_00270	智人 periplakin (PPL)
A	D	0.615572	Hs.268515	NM_00243	脑膜瘤 (以平衡转移分布) 1/FL=gb:D63807.1
P	D	0.615572	UG=Hs.31	AF096304	智人推定的甾醇还原酶 SR-1 (TM7SF2) 跨膜 7 超家族 2/FL=gb:AF096304.1
P	D	0.615572	Hs.93199	D63807.1	羊毛固醇合酶(2,3-氧鲨烯-羊毛固醇环化酶)/FL=gb:D63807.1
P	D	0.574349	Hs.119597	AB032261	硬脂酰-CoA 去饱和酶(δ -9-去饱和酶)/FL=gb:AF097514.1 gb:NM_005063 gbL/ab932261.1

[0278]

P	D	0.574349	Hs.174140	AI971281	ATP 柠檬酸裂解酶 /FL=gb:NM_001096.1
P	D	0.574349	Hs.171825	NM_00367	包含基本的螺旋-环-螺旋结构域, 种类 B, 2/FL=gb:AB004066.1 gb:NM_003670.1
P	D	0.574349	Hs.79103	AW235051	细胞色素 b5 线粒体外膜前体 /FL=gb:BC004373.1 gb:NM_030579.1
P	D	0.574349	Hs.11806	NM_00136	脱氢胆甾醇还原酶 /FL=gb:BC000054.1 gb:AF034544.1 gb:AF067127.1 gb:AF096305 gb:NM_001360.1
P	D	0.574349	Hs.3838	NM_00662	血清诱导的激酶/FL=gb:AF059617.1 gb:NM_006622.1 gb:AF223574.1
P	D	0.574349	Hs.213289	AI861942	低密度脂蛋白受体(家族性高胆固醇血症) /FL=gb:NM_000527.2
P	D	0.574349	Hs.92199	AW084510	羊毛固醇合酶(2,3-氧鲨烯-羊毛固醇环 化酶) /FL=gb:NM_002340.1 gb:NM_U22526.1
P	D	0.574349	Hs.5920	NM_00547	UDP-N-乙酰葡萄糖胺-2-表异构酶-N-乙 酰甘露糖胺激酶
P	D	0.574349	Hs.1524	NM_00381	肿瘤坏死因子(配体)超家族, 成员 9/FL=gb:NM_003811.1 gb:U03308.1
P	D	0.574349	Hs.278544	BC000408	乙酰-辅酶 A 乙酰基转移酶 2 (乙酰乙 酰基辅酶 A 硫解酶) /FL=gb: BC000408.1
P	D	0.574349	Hs.174140	U18197.1	ATP 柠檬酸合酶/FL=gb:U18197.1
P	D	0.574349	Hs.7232	B3855983	乙酰-辅酶 A 羧化酶 α/FL=gb:NM_000664.1 gb:U19822.1
P	D	0.535887	Hs.226213	NM_00078	细胞色素 P450, 51 (羊毛固醇 14-α-脱 甲基酶) /FL=gb:U23042.1 gb:NM_000786 gb:D55653.1
A	D	0.535887	Hs.268490	NM_00047	核受体亚家族 O, B 组, 成员 1/FL=gb:NM_000475.2
P	D	0.535887	Hs.48876	:AA872727	法呢基-二磷酸法呢基转移酶 /FL=gb:L06070.1 gb:L06105.1 gb:NM_004462.1
P	D	0.535887	Hs.65270	NM_00603	酯酶, 内皮的 /FL=gb:AF118767.1 gb:NM_006033.1
		0.535887	Hs.14779	AK000162	乙酰-CoA 合成酶
		0.535887	Hs.44499	U59479.1	桥粒相关蛋白(pinin), 桥粒缔合蛋白 /DEF= 人嗜中性粒细胞蛋白 mRNA, 部分 cds

[0279]

P	D	0.5	Hs.154654	AU144855	细胞色素 P450, 亚家族 I (二噁英-诱导的), 多肽 1 (青光眼 3, 原发性幼儿期的)
P	D	0.5	Hs.11899	AL518627	<u>3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶 A 还原酶 /FL=gb:M11058.1 gb:NM_000859.1</u>
		0.5	Hs.2178	NM_00352	H2B 组蛋白家族, 成员 Q/FL=gb:NM_003528.1
P	D	0.5	Hs.130607	NM_00043	<u>甲羟戊酸激酶 (甲羟戊酸尿症) /FL=gb:M88468.1 gb:NM_000431.1</u>
P	D	0.5	Hs.284244	NM_00200	成纤维细胞生长因子 2 (碱性) /FL=gb:M27968.1 gb:NM_002006.1
P	D	0.5	Hs.71465	AF098865	<u>鲨烯环氧酶 /FL=gb:D78130.1 gb:AF098865.1 gb:NM_003129.2</u>
P	D	0.5	Hs.288031	D85181.1	甾醇-C5-去饱和酶(真菌 ERG3, δ-5-去饱和酶)-样/FL=gb:D85181.1
A	D	0.5		L32662.1	前列腺素 E2 受体 /DB_XREF=gi:484163/FL=gb:L32662.1
P	D	0.5	Hs.81412	D80010.1	lipin 1
P	D	0.466517	Hs.11899	NM_00085	<u>3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶 A 还原酶 /FL=gb:M11058.1 gb:NM_000859.1</u>
P	D	0.466517	Hs.79440	NM_00654	IGF-II mRNA-结合蛋白 3/FL=gb:U07188.1 gb:U76705.1 gb:AF117108.1 gb:NM_006547.1
P	D	0.466517	Hs.75318	AL575074	微管蛋白, α 1 (睾丸特异性的)
P	D	0.466517	Hs.226213	U40053	<u>细胞色素 P450, 51 (羊毛固醇 14-α-脱甲基酶)</u>
P	D	0.466517	Hs.187579	NM_01637	羟基类固醇 (17-β) 脱氢酶 7 /FL=gb:AF098786.2 gb:NM_016371.1
P	D	0.466517	Hs.76038	BC005247	异戊烯基 - 二磷酸 δ 异构酶 /FL=gb:BC005247.1
P	D	0.466517	Hs.57698	BC000245	NAD(P) 依赖性类固醇脱氢酶样; H105e3/FL=gb:BC000245.1 gb:U4710 gb:NM_015922.1
P	D	0.353553	Hs.77910	NM_00213	<u>3-羟基-3-甲基戊二酰-辅酶 a 合酶 1 (可溶的) /FL=gb:BC000297.1 gb:L25798.1 gb:NM_015922.1</u>
P	D	0.329877	Hs.56205	BE300521	<u>胰 岛 素 诱 导 基 因 1/FL=gb:NM_005542.1</u>
P	D	0.329877	Hs.154654	NM_00010	细胞色素 P450, 亚家族 I (二噁英-诱导的), 多肽 1 (青光眼 3, 原发性幼儿期的) /FL=gb:NM_000104.2 gb:U0
P	D	0.329877	Hs.3828	AI189359	<u>甲羟戊酸酯 (二磷) 脱羧酶</u>

[0280]

					/FL=gb:U49260.1	gb:CB000011.1
					gb:NM_002461.1	

[0281] 为了证实法图他汀削弱SREBP的功能,在有或无法图他汀存在的情况下,测定CHO-K1细胞中内源性SREBP激活SREBP-响应性报道基因的能力(图18A)。法图他汀减少报道基因的激活,其中荧光素酶的表达受到甾醇调控元件的控制。法图他汀对外源性表达的SREBP-1的成熟形式(氨基酸1-436)激活报道基因的能力的影响有限(图18B),表明法图他汀削弱SREBP的激活过程。

[0282] 为了确定法图他汀是否影响ER-高尔基体转移和SREBP的蛋白水解加工,采用Sakai等人(1998)开发的报道子测定。转染的CHO-K1细胞中的PLAP-BP2保持膜结合,除非其被高尔基体中的S1P切割并且分泌到培养基中。在该测定中,与缺乏NH2-端DNA-结合结构域的SREBP-2片段融合的分泌的碱性磷酸酶(PLAP-BP2513-1141)允许通过产生荧光的磷酸酶底物的荧光变化监测转移和加工(图18C)。当用编码PLAP-BP2513-1141和SCAP的质粒共转染细胞时,分泌PLAP磷酸酶,产生荧光信号。加入法图他汀或甾醇可类似地减少分泌(图18C)。法图他汀介导的SREBP激活的抑制通过SREBP的蛋白质印迹分析得到证实。用法图他汀处理CHO-K1细胞降低SREBP-2的68KDa成熟形式的量并增加125KDa前体形式的量(图18D)。关于SREBP-1,获得类似的结果(图22)。这些结果共同表明,法图他汀阻断两种SREBP同种型的激活过程。

[0283] 本发明人认为,法图他汀削弱高尔基体中的SREBP蛋白水解切割或SCAP/SREBP复合物的ER-高尔基体转移。已知布雷菲德菌素A(Brefeldin A),一种阻断蛋白质从ER顺行转移至高尔基体的天然产物,可导致SREBP对甾醇无应答,并且通过使S1P从高尔基体重新定位到ER导致SREBP在ER中组成性加工(DeBose-Boyd等人,1999)。在布雷菲德菌素A的存在下,法图他汀对SREBP加工无影响(图19A),这表明法图他汀不能阻断蛋白水解本身。

[0284] 为了测定法图他汀是否阻断SCAP/SREBP复合物的ER-到高尔基体转移,本发明人分析高尔基体中SCAP的N连接糖基化的程度。SCAP含糖基化的腔环(luminal loop),其被保护免于胰蛋白酶的蛋白水解,并且识别抗-SCAP IgG-9D5。当SCAP位于ER中时,环中的两个寡糖对内切糖苷酶H敏感。当SCAP被转运到高尔基体时,其糖变得耐受内切糖苷酶H的消化。与ER结合的SCAP相比,转移的SCAP具有较高的糖基化水平,并且对内切糖苷酶H的耐受性更强。甾醇通过抑制ER-高尔基体转移防止SCAP变得耐受内切糖苷酶H(Nohturfft等,1998)。将细胞在不存在或存在法图他汀或甾醇的条件下生长,相继用胰蛋白酶和内切糖苷酶H处理膜级分。在不合法图他汀和甾醇的情况下生长的细胞中,SCAP的胰蛋白酶解片段更耐受内切糖苷酶H,并且具有一条或两条糖链(图19B,泳道1)。细胞在法图他汀或甾醇的存在下生长时,SCAP片段对内切糖苷酶H的耐受性较小,并且没有或只有一条糖链(图19B,泳道2和3)。因此,法图他汀表现为抑制SCAP从ER到高尔基体的转移。

[0285] 法图他汀的结构-活性关系的研究表明,当用各种烷基或芳基磺酰胺基修饰其甲苯结构部分时,分子的生物学活性被保留或者甚至提高。一种荧光衍生物,丹酰法图他汀(图20A)保留其阻断SREBP激活的能力(图24),并且用作显微探针。共聚焦显微分析揭示了与ER-tracker red(ER的特异性标记物)的定位重合的丹酰法图他汀的定位(图20B)。相反,缺少法图他汀的对照丹酰分子不能定位到任何细胞器。选择性ER定位暗示法图他汀结合ER

中的蛋白质;最有可能的候选物是SCAP,它是用于控制SREBP的胆固醇的靶标(Radhakrishnan等人,2004)。为检验这种假设,从细胞裂解物纯化结合于法图他汀-聚脯氨酸接头-生物素缀合物的蛋白质(图20A)(Sato等人,2007),并用针对SCAP、SREBP-1、SREBP-2和ATF6(一种不相关的ER结合转录因子)的抗体通过蛋白质印迹进行分析(Ye等人,2000)。结果表明,法图他汀结合于SCAP,但不结合其他蛋白质(图20C)。当加入过量法图他汀时,所述结合丧失,而过量的胆固醇却不会这样(图20D),这提出这样的可能性,即法图他汀可能与与胆固醇不同的位点与SCAP相互作用。

[0286] 已确定SREBP在脂肪生成中的关键作用,然后,在不受控制的食物摄取条件下检验法图他汀对ob/ob小鼠(一种肥胖小鼠模型)的药理学作用。每天腹腔内递送法图他汀,监测食物摄取和体重。处理的小鼠平均的每日食物摄取与对照无显著性差异(分别为 5.4 ± 1.5 相对于 5.9 ± 1.4 g/小鼠/天, $p > 0.05$),并且在处理期间未观察到明显毒性。用法图他汀处理28天后,处理的小鼠比未处理的对照轻约12%(分别为 32.1 ± 1.4 和 36.22 g/小鼠, $p = 0.02$)。ob/ob小鼠中最独特的表型之一是胰岛素抵抗导致的高血糖症。血液成分检查揭示,处理的小鼠的平均葡萄糖水平比未处理的小鼠低约70%(分别为 153.2 ± 30.5 相对于 429.4 ± 87 mg/dl, $p = 0.003$),其在正常葡萄糖水平的范围内。这些结果与报道的SREBP-1c在肝胰岛素抵抗发病机理中的作用相一致(Ide等人,2004)。

[0287] ob/ob小鼠的另一种表型是器官中脂肪过度蓄积,包括非酒精性脂肪肝。在未处理的ob/ob小鼠中,由它们苍白的颜色明显显现膨大的和脂肪性的肝脏,而用法图他汀处理的小鼠肝脏表现正常。与未处理的小鼠相比,处理的小鼠的肝脏轻 $\sim 32\%$,并且脂肪垫较小。肝脏切片的Oil red染色表明,未处理的ob/ob小鼠的肝脏含有丰富的脂肪滴,而处理的小鼠肝脏包含较低水平的脂质蓄积(图21)。处理的小鼠肝脏中的甘油三酯和胆固醇水平也下降。法图他汀防止ob/ob小鼠脂肪肝与报道的SREBP-1在脂肪肝发生中的作用一致:过表达SREBP-1的转基因小鼠发生脂肪肝,而缺乏SREBP-1的ob/ob小鼠($lep^{ob/ob} \times Srebp1^{-/-}$)具有健康的肝脏(Yahagi等人,2002)。

[0288] 认为处理的小鼠中的肝脂肪水平下降是因为SREBP-响应性脂肪生成酶的肝表达降低。因此,检查法图他汀对代表性SREBP-响应性脂肪生成酶,包括脂肪酸合酶(FAS)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、硬脂酰辅酶A去饱和酶1(SCD1)和ATP柠檬酸裂解酶(ACL)的肝蛋白水平和酶活性的作用。生化分析表明,在法图他汀处理的小鼠的肝脏提取物中,脂肪生成酶的蛋白水平和活性下降(图25A-25C)。因此,法图他汀阻断肝脏中的SREBP-1加工,下调脂肪生成酶并且降低肝甘油三酯存储。法图他汀代表抑制SREBP激活的第一种非胆固醇类合成分子。

[0289] 荧光素酶报告子测定。第0天,将CHO-K1细胞铺板到96孔板上在培养基A(Ham's F-12培养基与Dulbecco's改良的Eagle's培养基的1:1混合物,具有5%胎牛血清、100单位/mL青霉素和100 μ g/mL硫酸链霉素)中。第2天,采用Lipofectamine试剂(Invitrogen),用pSRE-Luc(一种SRE-1驱动的荧光素酶报告子构建体)(Hua等人,1995)和pAc- β -gal(β -gal报告子,其中 β -gal的表达受到肌动蛋白启动子控制)瞬时共转染细胞。培育5小时后,用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤细胞,然后在不存在或存在法图他汀的条件下,在培养基B(Ham's F-12培养基与Dulbecco's改良的Eagle's培养基的1:1混合物,具有5%去脂血清,100单位/mL青霉素,100 μ g/mL硫酸链霉素,50mM康帕丁(compactin)和50mM甲羟戊酸钠)中进行培育。培育20小时后,将各孔中的细胞裂解,并将等分试样用于测定荧光素酶和 β -半乳糖苷酶活性。由 β -

半乳糖苷酶的活性标准化荧光素酶活性。对于SREBP-1c的N端成熟形式的过表达,用pSRE-Luc和pAc- β -gal共转染pCMV-SREBP-1c(1-436)。

[0290] SREBP加工的蛋白质印迹分析。第0天,将CHO-K1细胞铺板到培养基A的100mm培养皿上。第2天,用PBS洗涤细胞,然后在不存在或存在法图他汀的条件下,在培养基B中进行培育。第3天,将细胞用冷的PBS洗涤一次,然后用含10mM Tris-HCl, pH 7.6, 100mM NaCl, 1% (w/v) SDS和蛋白酶抑制剂混合物(1 μ g/ml胃酶抑素A、10 μ g/ml亮抑酶肽、200 μ M苯基甲基磺酰氟)的缓冲液处理。测定各总细胞提取物的蛋白质浓度(BCA试剂盒;Pierce),然后将细胞提取物的22-33 μ g等分试样与0.25体积的缓冲液(250mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 25% 甘油, 0.2% (w/v) 溴酚蓝和5% (v/v) 2-巯基乙醇)混合,在95 $^{\circ}$ C加热7分钟。样品在10% SDS-PAGE凝胶上进行分离,用针对SREBP-2的小鼠单克隆抗体(IgG-7D4)印迹(Yang等人,1995)。用增强的化学发光(ECL)检测试剂(Amersham)将特定的条带可视化。

[0291] SCAP寡糖的修饰。如本文其他部分所述制备细胞膜级分。将膜团粒重悬于含有10mM Hepes $\cdot$ KOH (pH 7.4), 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM EDTA钠和100mM NaCl的0.1mL缓冲液中。然后,将蛋白质的等分试样在30 $^{\circ}$ C、在不存在或存在在58 μ L的总体积中的1 μ g胰蛋白酶的条件下培育30分钟。通过加入2 μ L (400单位) 大豆胰酶抑制剂终止反应。对于用内切糖苷酶H的后续处理,各个样品接受10 μ L含有3.5% (重量/体积) SDS和7% (体积/体积) 2-巯基乙醇的溶液。在100 $^{\circ}$ C加热10分钟后,各个样品相继接受加入9 μ L 0.5M柠檬酸钠 (pH 5.5), 5 μ L含有17'蛋白酶抑制剂的溶液(浓度1x,对应于10 μ g/mL亮抑酶肽,5 μ g/mL胃酶抑素A和2 μ g/mL抑酶肽),然后是1 μ L (5单位) 内切糖苷酶H。反应在37 $^{\circ}$ C进行过夜,并且通过加入20 μ L含有0.25M Tris $\cdot$ HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% (体积/体积) 甘油, 0.05% (重量/体积) 溴酚蓝和4% 2-巯基乙醇的缓冲液终止反应。然后将混合物在100 $^{\circ}$ C加热5分钟,并进行SDS/PAGE (12%凝胶)。

[0292] 共聚焦显微分析。将 $\sim$ 70%汇合的玻璃底96孔板(Grainer)上的CHO-K1细胞与0.2 μ M ER-tracker Red (Invitrogen) 和5mM丹酰法图他汀培育1小时。用配备CSU10转盘共聚焦扫描仪(Yokogawa Electric Corporation)和ORCA-CCD相机(Hamamatsu Photonics)的Carl Zeiss LSM 510共聚焦显微镜获取并分析荧光图像。用IPLab软件(Solution Systems)分析图像。

[0293] 结合测定。如补充方法中所述制备细胞膜级分。用含有0.1% FOS-Choline 10 (Hampton Research) 的PBS提取膜级分。将提取物与用生物素化的法图他汀饱和的中性链亲和素(Nutravidine)-琼脂糖小珠(10 μ L)混合并培育1小时。结合的蛋白用含有0.1% FOS-Choline 10的PBS洗涤四次,在25 μ L SDS样品缓冲液中煮,并进行蛋白质印迹。对于竞争测定,将饱和量的胆甾醇或法图他汀加入膜提取物中,然后与所述小珠一起培育。

[0294] 动物研究步骤。使4-5周龄的纯合雄性肥胖(ob/ob)小鼠(C57BL/6J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)居住在受控条件下(12小时光/暗循环;25 $^{\circ}$ C)。每只笼子养5只动物,并且在它们到达后,所述动物可自由接近标准实验室饲料(Purina Mills, Richmond, IN)和水达一周。在实验第一天以及随后的每一天,在3:00至5:00p.m.之间测量每只小鼠的重量以及食物摄取量。重量测量后,处理的小鼠接受ip注射法图他汀(30mg/kg;150 μ L),对照小鼠接受在PBS中的10% DMSO。每天注射持续4周,直到研究结束。

[0295] 血液成分。每天注射法图他汀28天后,将小鼠禁食5-6小时,用Glucometer

Precision Xtra (Abbott) 测定全血葡萄糖和 β -羟基丁酸酯。通过Comparative Pathology Laboratory (Baylor College of Medicine) 进行血清成分,葡萄糖,甘油三酯和胆甾醇的测定。采用NEFA C试剂盒 (Wako Chemicals, Richmond, VA) 测定血清非酯化脂肪酸 (NEFA)。

[0296] 肝脏分析。处死小鼠,并确定肝脏和附睾脂肪垫重量。用Oil Red O染色来自各个动物的肝脏切片的冷冻切片,以可视化肝脏切片中的脂肪滴(甘油三酯),如所述的那样 (Abu-Elheiga等人,2001)。剩余的肝脏组织在液氮中冷冻,并在 -80°C 保存以备进一步分析。

[0297] 组织甘油三酯和胆甾醇含量。采用Cholesterol E Kit (Wako) 和Infinity Triglyceride Kit (Thermo Electron, Melbourne, Australia), 如Chandler等人(2003)所述的那样测定肝脏甘油三酯和胆甾醇的含量。

[0298] 合成法图他汀1、丹酰法图他汀和法图他汀-聚脯氨酸接头-生物素缀合物

[0299] 图23显示了法图他汀1、丹酰法图他汀、法图他汀-聚脯氨酸接头-生物素缀合物的合成以及合成的中间体。

[0300] 法图他汀1的合成

[0301] 在搅拌条件下,将丙硫异烟胺 (1.03g, 5.70mmol) 和2-溴-4'-甲基苯乙酮 (1.22g, 5.70mmol) 在乙醇 (20ml) 中的混合物在 70°C 加热0.5小时,然后冷却至 0°C 。对形成的黄色沉淀进行过滤,用冷乙醇洗涤,干燥后得到黄色针状物的2-丙基-4-(4-对甲基苯基噻唑-2-基)吡啶(法图他汀) 1HBr盐 (1.78g, 83%)。mp: $190-193^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.88 (d, $J=6.2\text{Hz}$, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.46 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 8.36 (dd, $J=1.4, 6.2\text{Hz}$, 1H), 7.99 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.31 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 3.03 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.80 (m, 2H), 0.96 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 161.3, 158.5, 156.9, 146.2, 143.2, 138.4, 130.4, 129.5, 126.3, 122.3, 120.3, 119.5, 35.0, 22.4, 20.9, 13.4; HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 对于 $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{S}$ 计算值295.1269;实测295.1269。

[0302] 4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺16的合成

[0303] 在压力管中装入2 (1.08g, 3.0mmol)、二苯甲酮亚胺 (benzophenone imine) (0.57g, 3.3mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (86mg, 0.15mmol)、BINAP (280mg, 0.45mmol)、叔丁醇钠 (1.44g, 9.0mmol) 和无水甲苯 (30mL) 并用氩气吹扫。将压力管密封并在 100°C 浴中加热20小时。冷却至室温后,反应混合物经色谱法处理 (SiO_2 , 4:1己烷:EtOAc), 得到1.35g黄色油状物8 (98%)。然后,在8 (1.35g, 2.9mmol) 的THF (20mL) 溶液中加入2N HCl水溶液 (15mL)。室温搅拌2小时后,将反应混合物进行减压浓缩,然后用EtOAc (100mL) 稀释,并用饱和 Na_2CO_3 (50mL) 溶液洗涤。含水洗涤液用EtOAc (3x 40mL) 萃取,并将合并的EtOAc层用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理 (SiO_2 , 4:1己烷:EtOAc), 得到0.73g为白色晶体的4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺16 (82%)。 ^1H NMR (600MHz, CDCl_3): δ 8.61 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 7.80 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H), 7.75 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 7.67 (dd, $J=1.4, 4.8\text{Hz}$, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.75 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H), 3.82 (brs, 1H), 2.85 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.01 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H); ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3): δ 164.9, 163.4, 157.3, 150.0, 146.8, 140.8, 127.7, 124.8, 119.2, 117.8, 115.1, 111.3, 40.4, 23.1, 13.9; HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 对于 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}$ 计算值296.1221;实测296.1228。

[0304] 丹酰法图他汀的合成

[0305] 向16 (50mg, 0.17mmol) 和吡啶 (27mg, 0.34mmol) 在CH₂Cl₂ (5mL) 中的磁力搅拌的溶液加入丹酰氯 (50mg, 0.18mmol)。搅拌17小时后, 将反应混合物减压浓缩, 并将残留物在EtOAc (50mL) 和饱和NH₄Cl溶液 (20mL) 间进行分配。水相用EtOAc (2x 20mL) 萃取。合并的萃取物用饱和NaHCO₃溶液洗涤, 用Na₂SO₄干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理 (SiO₂, 2:1己烷:EtOAc), 得到为黄色晶体的丹酰法图他汀 (65mg, 73%)。¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ8.60 (d, J=4.8Hz, 1H), 8.50 (d, J=8.2Hz, 1H), 8.36 (d, J=8.3Hz, 1H), 8.21 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.76 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.70 (d, J=1.5Hz, 1H), 7.62 (dd, J=1.5, 4.8Hz, 1H), 7.61 (t, J=8.3Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.43 (dd, J=7.5, 8.2Hz, 1H), 7.19 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.04 (d, J=8.6Hz, 2H), 6.97 (brs, 1H), 2.87 (s, 6H), 2.84 (t, J=7.6Hz, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.00 (t, J=7.6Hz, 3H); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ165.5, 163.5, 156.1, 152.2, 150.0, 140.5, 136.7, 134.0, 131.1, 131.0, 130.5, 129.8, 129.7, 128.7, 127.3, 123.1, 121.6, 119.2, 118.3, 117.8, 115.3, 113.8, 45.4, 40.4, 23.1, 13.9; HRMS (m/z): [M+H]⁺对于C₂₉H₂₉N₄O₂S₂计算值529.1732; 实测529.1733。

[0306] 4-(2-(2-丙基吡啶-4-基) 噻唑-4-基) 苯基氨基甲酸叔丁酯40的合成

[0307] 向16 (0.57g, 1.92mmol) 和4-(二甲基氨基) 吡啶 (5mg, 0.4mmol) 在THF (20mL) 中的磁力搅拌的溶液加入二碳酸二叔丁酯 (0.49g, 2.21mmol)。搅拌17小时后, 将反应混合物减压浓缩, 并将残留物在EtOAc (100mL) 和饱和NH₄Cl溶液 (30mL) 间进行分配。水相用EtOAc (2x 50mL) 萃取。合并的萃取物用饱和NaHCO₃溶液洗涤, 用Na₂SO₄干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理 (SiO₂, 2:1己烷:EtOAc), 得到为黄色泡沫状物的4-(2-(2-丙基吡啶-4-基) 噻唑-4-基) 苯基氨基甲酸叔丁酯40 (0.33g, 43%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ8.68 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.93 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.72 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.47 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 2.90 (t, J=7.5Hz, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.55 (s, 9H), 1.03 (t, J=7.5Hz, 3H); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ163.1, 156.5, 152.3, 149.6, 140.6, 138.5, 128.7, 128.1, 127.0, 118.3, 117.7, 114.3, 112.9, 80.6, 41.0, 28.4, 24.1, 13.7; HRMS (m/z): [M+H]⁺对于C₂₂H₂₆N₃O₂S计算值396.1746; 实测396.1738。

[0308] R=N(Boc)CH₂CH₂CH₂COOH中间体的合成

[0309] 在N₂气氛中, 将40 (200mg, 0.51mmol) 加入NaH (在矿物油中的60%分散液, 24mg, 0.6mmol) 在DMF (5mL) 中的悬浮液, 并将该混合物在室温搅拌2小时。然后, 加入在DMF (2mL) 中的NaI (91mg, 0.6mmol) 和4-溴丁酸乙酯 (0.12g, 0.6mmol)。搅拌18小时后, 将该反应混合物倒入水 (20mL) 中, 并用EtOAc (2x 50mL) 萃取。合并的萃取物用Na₂SO₄干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理 (SiO₂, 2:1己烷:AcOEt), 得到为黄色油状物的11 (35mg, 13%)。然后向11 (30mg, 2.9mmol) 在THF (1mL) 和MeOH (0.5mL) 中的溶液加入2N NaOH水溶液 (0.2mL)。室温搅拌18小时后, 将该反应混合物减压浓缩, 然后用EtOAc (10mL) 稀释, 用饱和NH₄Cl溶液 (5mL) 洗涤。含水洗涤液用EtOAc (2x 10mL) 萃取, 并将合并的EtOAc层用Na₂SO₄干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理 (SiO₂, EtOAc), 得到14mg为白色泡沫状物的R=N(Boc)CH₂CH₂CH₂COOH中间体 (50%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ8.69 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.95 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.73 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.51 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 2.92 (m, 4H), 2.33 (m, 2H), 1.90 (m, 4H), 1.50 (s, 9H), 1.02 (t, J=7.5Hz, 3H); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ174.2, 162.9, 156.3, 152.9, 149.6, 140.6, 138.5, 129.3, 128.9, 127.2, 119.0, 117.9,

114.8, 113.3, 80.8, 41.0, 40.3, 32.1, 28.4, 24.1, 21.1, 13.7; HRMS (m/z): $[M+H]^+$ 对于 $C_{26}H_{32}N_3O_4S$ 计算值 482.2114; 实测 482.2120。

[0310] 4-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基氨基)-N-异丙基丁酰胺的合成

[0311] 向 $R=N(\text{Boc})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 中间体 (17mg, 0.035mmol)、三乙胺 (17 μ l, 0.14mmol) 和异丙胺 (4 μ l, 0.046mmol) 在 DMF (0.5mL) 中的溶液中加入 HATU (16mg, 0.042mmol)。搅拌 18 小时后, 将该反应混合物减压浓缩, 并将残留物在 EtOAc (20mL) 和饱和 NH_4Cl 溶液 (10mL) 间进行分配。水相用 EtOAc (2x 10mL) 萃取。合并的萃取物用饱和 NaHCO_3 溶液洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理 (SiO_2 , 2:1 己烷:EtOAc), 得到为黄色油状物的 N-Boc 保护的 4-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基氨基)-N-异丙基丁酰胺 (14mg, 77%)。然后, 向 13 (12mg, 2.9mmol) 在 THF (1mL) 中的溶液加入 TFA (0.2mL)。室温搅拌 18 小时后, 将该反应混合物减压浓缩, 然后用 EtOAc (20mL) 稀释, 并用饱和 NH_4Cl 溶液 (10mL) 洗涤。含水洗涤液用 EtOAc (2x 5mL) 萃取, 并将合并的 EtOAc 层用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理 (SiO_2 , 2:1 己烷:EtOAc), 得到 6.2mg 为黄色泡沫状物的 4-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基氨基)-N-异丙基丁酰胺 (63%)。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3): δ 8.69 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 8.04 (1H, s), 7.96 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.72 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 7.51 (s, 1H), 6.65 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.03 (m, 4H), 2.35 (m, 2H), 1.92 (m, 4H), 1.25 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 6H), 1.03 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3): δ 171.6, 162.9, 156.3, 152.9, 140.6, 138.5, 129.3, 128.9, 127.2, 119.0, 117.9, 114.8, 113.3, 42.2, 41.0, 40.3, 32.1, 24.1, 23.2, 21.1, 13.7; HRMS (m/z): $[M+H]^+$ 对于 $C_{24}H_{31}N_4OS$ 计算值 423.2219; 实测 423.2216。

[0312] 法图他汀-聚脯氨酸接头-生物素缀合物的合成

[0313] 法图他汀-KPGQFLYELKKPPPPPPPPPKK (SEQ ID NO:15)-氨基己酸-生物素。

[0314] 在 Rink-Amide MBHA 树脂上通过偶联 N- α -Fmoc 保护的氨基酸、N- ϵ -Fmoc-e-氨基己酸、 $R=N(\text{Boc})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 中间体、生物素而合成缀合物, 如所述通过反相 HPLC 进行纯化 (Sato 等人, 2007)。缀合物 3: 对于 $C_{155}H_{238}N_{35}O_{29}S_2^+$ 计算值需要是 3119.9。实测 (MALDI-TOF-MS) 为 3119.7 $[M+H]^+$ 。

[0315] 质粒。pSRE-Luc、pCMV-SREBP-1c (1-436)、pCMV-PLAP-BP2 (513-1141) 和 pCMV-SCAP 由 J.L.Goldstein 和 M.S.Brown (University of Texas Southwestern Medical Center) 馈赠 (Sakai 等人, 1998; Hua 等人, 1995)。

[0316] 抗体。单克隆抗-SREBP-1 IgG (2A4)、抗-SCAP IgG (9D5) 和抗-ATF6 IgG (H-280) 购自 Santa Cruz Biotechnology。单克隆抗-SREBP-2 IgG-7D4 由 J.L.Goldstein 和 M.S.Brown (University of Texas Southwestern Medical Center) 馈赠。多克隆抗-FA、抗-ACC、抗-SCD1 和抗-ACL IgG 购自 BD Biosciences。

[0317] 细胞培养。将中国仓鼠卵巢细胞 K1 (CHO-K1) 细胞保持在具有 5% 胎牛血清、100 单位/mL 青霉素和 100 μg /mL 硫酸链霉素的 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基/Ham's F12 培养基 [1:1] 中在 37 $^\circ\text{C}$ 在 5% CO_2 下。将人雄激素非依赖性前列腺癌细胞 (DU145) 保持在含有 2mM L-谷氨酰胺, 1.0mM 丙酮酸钠, 0.1mM 非必需氨基酸和 1.5g/L 碳酸氢钠以及 10% 胎牛血清, 100 单位/mL 青霉素和 100 μg /mL 硫酸链霉素的 Eagle's 最小必需培养基中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 在 5% CO_2 下。

[0318] 细胞膜级分的制备。收集细胞, 然后重悬在缓冲液 (10mM Hepes • KOH (pH 7.4),

10mM KCl, 1.5mM MgCl₂和1mM EDTA钠)中,通过22号针头,并在1,000×g离心5分钟。然后将核上清液在15,000×g离心30分钟,去除上清液。

[0319] 寡核苷酸微阵列分析。在1μg/mL IGF1存在下,在无血清培养基中用5mM法图他汀或仅DMSO处理DU145前列腺癌细胞6小时,在TRI试剂(Molecular Research Center)中提取总RNA并通过RNeasy Mini Kit(Qiagen)进一步分离。在Baylor College of Medicine Microarray Core Facility通过Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array分析纯化的mRNA,所述Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array由几乎45,000种探针组构成,所述探针组代表来源于大约33,000种已证实的人类基因的超过39,000种转录物(Affymetrix, Inc.)。

[0320] RT-PCR实验。从DU145细胞将总RNA提取到TRI试剂(Molecular Research Center)中并用RNeasy Mini Kit(Qiagen)进行分离。采用Access RT-PCR System(Promega)对RNA样品进行RT-PCR。RT-PCR反应包含总RNA, 1μM的各种引物, 0.2mM dNTP, 1mM MgSO₄, AMV反转录酶(2单位)和Tf1 DNA聚合酶(2单位), 终体积25μL。所用的引物对如下:对于低密度脂蛋白受体(LDLR)是5'-TCA GAC CGG GAC TGC TTG GAC GGC TCA GTC-3'(SEQ ID NO:16)和5'-CCA CTT AGG CAG TGG AAC TCG AAG GCC G-3'(SEQ ID NO:17);对于硬脂酰辅酶A去饱和酶(SCD)是5'-GCC TGC TTG ATA ATA TAT AAA C-3'(SEQ ID NO:18)和5'-CAC TTG AAT TGA GCT TTA G-3'(SEQ ID NO:19);对于ATP柠檬酸裂解酶(ACL)是5'-AAG AAA AAG TGT CAG ACA GCT GG-3'(SEQ ID NO:20)和5'-TGG ACT GAA GGG GTG TTA GC-3'(SEQ ID NO:21);对于3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMG-CoAR)是5'-GCC CGA CAG TTC TGA ACT GGA ACA-3'(SEQ ID NO:22)和5'-GAA CCT GAG ACC TCT CTG AAA GAG-3'(SEQ ID NO:23);对于甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶(MVD)是5'-CTG CCT GAC TGC CTC AGC-3'(SEQ ID NO:24)和5'-ACC TCT CCT GAC ACC TGG G-3'(SEQ ID NO:25);对于胰岛素诱导基因1(INSIG1)是5'-AAG ACT TCA GGG TAA GTC ATC A-3'(SEQ ID NO:26)和5'-CGT GTA TAA TGG TGT CTA TCA G-3'(SEQ ID NO:27)。扩增条件如下:在94℃ 4分钟1次循环,然后在94℃变性40秒,在50℃退火40秒,在68℃延长2分钟,22次循环(对于SCD和HMG CoA R),在58℃退火并进行24次循环(对于LDLR和INSIG1),或者在60℃退火并进行24次循环(对于ACL),在55℃退火并进行30次循环(对于MVD)。通过琼脂糖凝胶分析扩增的DNA并用Scion-image软件进行定量。

[0321] PLAP-BP2切割。第0天,将CHO-K1细胞铺板到96孔板上在培养基A中。第2天,采用Lipofectamine试剂(Invitrogen),用pCMV-PLAP-BP2(513-1141)、pCMV-SCAP和pAc-β-gal瞬时共转染细胞。培育5小时后,细胞用PBS洗涤,然后在不存在或存在法图他汀(20μM)或甾醇(10μg/mL胆甾醇和1μg/mL 25-羟基胆甾醇)的条件下,在培养基B中培育。培养20小时后,测定培养基等分试样的分泌的碱性磷酸酶活性。将每孔中的细胞裂解,用于测定β-半乳糖苷酶活性。通过β-半乳糖苷酶的活性标准化碱性磷酸酶活性。

[0322] 酶活性和蛋白质印迹分析。在液氮中将冷冻的肝脏部分研磨成粉末。将粉末化组织悬浮在含有0.1mM PMSF、5mM苯甲脒和5mg/ml蛋白酶抑制剂混合物(Roche)的10ml PBS中,并用Polytron(3x30秒,高速)匀浆化,短时超声以降解DNA。将提取物通过以16,000×g离心20分钟澄清。测定上清液中的蛋白质浓度,并用针对FAS、ACC、SCD1和ACL的抗体进行蛋白质印迹分析。扫描感兴趣的蛋白质的特定条带的强度并针对b-肌动蛋白标准化以定量。如

之前所述(Mao等人,2006)测定肝提取物中FAS和ACC活性。

[0323] 实施例11

[0324] (R)-2-(4-(4-(甲基磺酰胺基)苯基)噻唑-2-基)吡咯烷-1-甲酸苄酯53的合成

[0325] 如图26中所述,在室温,向L-脯氨酸(1.14g,10.0mmol)在乙腈(100mL)中的溶液加入氯甲酸苄酯(1.55mL,11.0mmol)和三乙胺(2.79mL,20mmol)。将混合物在室温搅拌12小时,并用AcOEt稀释。将混合物倒入0.1M HCl溶液中,并且在有机层和水层之间分离。将有机层用饱和的NaHCO₃水溶液和盐水洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤,并浓缩。残留物通过硅胶柱色谱法纯化,产生为无色油的67(2.26g,91%)。

[0326] 将67(586mg,2.36mmol)和Lawesson试剂(1.05g,2.60mmol)在甲苯(30mL)中的混合物在90℃搅拌1小时。冷却至室温后,将蒸发溶剂。残留物通过硅胶柱色谱法纯化,产生为白色无定形固体的68(495mg,79%)。

[0327] 将68(300mg,1.13mmol)和4-溴苯酰溴(318mg,1.13mmol)在EtOH(10mL)中的混合物在回流下搅拌2小时。蒸发后,将残留物通过硅胶柱色谱法纯化,产生为白色固体的48(265mg,53%)。

[0328] 将48(230mg,0.519mmol)、Pd₂(dba)₃(9.50mg,2mol%)、BINAP(97%,20.0mg,6mol%)、叔丁醇钠(69.8mg,0.727mmol)和二苯甲酮亚胺(0.105mL,0.623mmol)在甲苯(5.0mL)中的混合物在回流下8小时。冷却至室温后,将混合物通过硅藻土(Celite)过滤,并且将滤液蒸发。残留物通过硅胶柱色谱法纯化,产生为黄色无定形固体的69(228mg,81%)。

[0329] 向69(175mg,0.321mmol)在THF(3mL)中的溶液加入HCl水溶液(4M,0.3mL),并且将混合物在室温搅拌1小时。将混合物用饱和的NaHCO₃水溶液中和,并用AcOEt萃取。将有机层用盐水洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤,并且浓缩。残留物通过硅胶柱色谱法纯化,产生为无色油状物的70(113mg,93%)。

[0330] 将70(92mg,0.24mmol)、甲磺酰氯(0.021mL,0.27mmol)和吡啶(0.043mL,0.53mmol)在CH₂Cl₂(2mL)中的混合物在室温搅拌8小时。加入MeOH后,将混合物用AcOEt稀释,并用饱和的NaHCO₃水溶液和盐水洗涤。将有机层干燥(Na₂SO₄),过滤,并且浓缩。将残留物通过硅胶柱色谱法纯化,产生为白色固体的53(91mg,83%)。

[0331] ¹H NMR(CDCl₃,600MHz,两个旋转异构体,比例=1:0.95) δ7.80-7.86(m,2H),7.14-7.41(m,7H),6.64(s,1H,主要的旋转异构体),6.83(s,1H,次要的旋转异构体),5.07-5.36(m,3H),3.73(m,1H),3.59(m,1H),3.03(s,3H,主要的旋转异构体),3.00(s,3H,次要的旋转异构体),2.28-2.39(m,2H),2.00-2.10(m,2H);¹³C NMR(CDCl₃,150MHz,两个旋转异构体,显示主要的峰)174.7,155.4,154.4,136.4,131.9,128.5,128.3,127.9,127.8,127.7,127.7,120.8,112.3,67.1,59.4,47.2,39.4,32.9,23.1;HRMS(FAB):对于C₂₂H₂₄N₃O₄S₂[M+H]⁺精确质量计算值458.1203;实测458.1200。

[0332] 实施例12

[0333] N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)甲磺酰胺(19)的合成

[0334] 如图27所示,在反应(a)中,将丙硫异烟胺(9.01g,50.0mmol)和4-溴苯酰溴6a(13.9g,50.0mmol)在EtOH(400mL)中的混合物在70℃搅拌1小时。冷却至室温后,将沉淀物用EtOAc滤出,并且用EtOAc和饱和的NaHCO₃水溶液洗涤。有机层用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,并且浓缩,产生为浅黄色固体的4-(4-溴苯基)-2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑2(14.3g,79%)。

[0335] 在反应(b)中,压力管中填装2(1.08g,3.0mmol)、二苯甲酮亚胺(0.57g,3.3mmol)、Pd₂dba₃(86mg,0.15mmol)、BINAP(280mg,0.45mmol),叔丁醇钠(1.44g,9.0mmol)和无水甲苯(30mL),并用氩气吹扫。将压力管密封并在100℃浴中加热20小时。冷却至室温后,反应混合物经色谱法处理(SiO₂,4:1己烷:EtOAc),得到1.35g黄色油状物71(98%)。

[0336] 然后,在反应(c)中,向71(1.35g,2.9mmol)在THF(20mL)中的溶液加入2M HCl水溶液(15mL)。在室温搅拌2小时后,将反应混合物进行减压浓缩,然后用EtOAc(100mL)稀释,并用饱和Na₂CO₃(50mL)溶液洗涤。含水洗涤液用EtOAc(3x 40mL)萃取,合并的EtOAc层用Na₂SO₄干燥并浓缩。粗产物经色谱法处理(SiO₂,4:1己烷:EtOAc),得到0.73g为白色晶体的4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺16(82%)。

[0337] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃):δ8.61(d,J=4.8Hz,1H),7.80(d,J=8.9Hz,2H),7.75(d,J=1.4Hz,1H),7.67(dd,J=1.4,4.8Hz,1H),7.36(s,1H),6.75(d,J=8.9Hz,2H),3.82(brs,1H),2.85(t,J=7.6Hz,2H),1.83(m,2H),1.01(t,J=7.6Hz,3H);¹³C NMR(150MHz,CDCl₃):δ164.9,163.4,157.3,150.0,146.8,140.8,127.7,124.8,119.2,117.8,115.1,111.3,40.4,23.1,13.9;HRMS(m/z):[M+H]⁺对于C₁₇H₁₈N₃S计算值296.1221;实测296.1228。

[0338] 在反应(d)中,在0℃向16(800mg,2.71mmol)和吡啶(0.66mL,8.1mmol)在CH₂Cl₂(20mL)中的搅拌的溶液加入甲磺酰氯(0.23mL,2.97mmol)。搅拌0.5小时后,将混合物倒入2M柠檬酸溶液中,并用EtOAc萃取。将合并的萃取物用饱和的NaHCO₃溶液和盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥,并浓缩,产生为黄色泡沫物的N-(4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯基)甲磺酰胺19(880mg,87%)。

[0339] ¹H NMR(300MHz,CD₃OD):δ8.55(d,J=5.2Hz,1H),8.02(d,J=8.8Hz,2H),7.95(s,1H),7.90(d,J=1.9Hz,1H),7.84(dd,J=1.9,5.2Hz,1H),7.34(d,J=8.8Hz,2H),3.00(s,3H),2.86(t,J=7.7Hz,2H),1.80(m,2H),1.01(t,J=7.3Hz,3H).m/z=374[M+H]⁺。

[0340] 实施例13

[0341] N-异丙基-4-(2-(2-丙基吡啶-4-基)噻唑-4-基)苯胺(17)的合成

[0342] 如图27所示,合成化合物17的方法利用与对于实施例12中的化合物19所述相同的步骤a-c。对于化合物17,在步骤e,向16(1.02g,3.45mmol)在CH₂Cl₂(20mL)中的搅拌的溶液加入丙酮(2.5mL,34.5mmol)和乙酸(2.0mL,34.5mmol)。将混合物搅拌1小时后,加入Na(OAc)₃BH(1.5g,6.9mmol)。将该混合物搅拌20小时。将该混合物倒入饱和的NaHCO₃溶液中,并用EtOAc萃取。将合并的萃取物用Na₂SO₄干燥并浓缩。粗产物的色谱法处理(SiO₂,4:1己烷/EtOAc)产生为白色泡沫物的17(845mg,73%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃):δ8.61(d,J=5.2Hz,1H),7.81(d,J=8.5Hz,2H),7.76(d,J=1.4Hz,1H),7.68(dd,J=1.4,5.2Hz,1H),7.34(s,1H),6.65(d,J=8.5Hz,2H),3.70(m,1H),2.86(t,J=7.6Hz,2H),1.83(m,2H),1.25(d,J=6.0Hz,6H),1.02(t,J=7.4Hz,3H).m/z=338[M+H]⁺。

[0343] 实施例14

[0344] 化合物45-66的SREBP激活测定

[0345] 按照实施例1中用于法图他汀A的方法,对表4中的鉴定的示例性化合物进行标准SREBP激活测定。在CHO_K1细胞中,在存在或不存在5μM的化合物45-55和19(图28)、化合物56-61和19(图29)和化合物62-66(图30)的条件下,测量内源性SREBP激活SREBP-响应性报道基因的转录的能力。其中,化合物61表现出约25%的SREBP激活抑制,化合物53表现出约

30%的抑制,化合物58表现出约42%的抑制,化合物19表现出约45%的抑制。确定化合物53(图31)和化合物58与61(图32)的抑制浓度。

[0346] 实施例15

[0347] 化合物19抑制人乳腺癌细胞系SUM159的生长并且下调脂肪生成途径

[0348] 用不同浓度的化合物19处理SUM159细胞48小时引起细胞生长抑制和毒性作用(图33A)。将细胞以5000个细胞/孔的密度接种到96孔板上在100 μ l包含2%活性炭处理的血清的培养基中。24小时后,加入不同浓度的化合物19,再达48小时。使用WST-1 Cell Viability and Proliferation Assay(ScienCell Research Laboratory, Carlsbad CA)测量细胞存活性。在用10 μ M处理的细胞中确定脂肪生成基因mRNA表达水平的变化。存在处于转录因子SREBP控制下的基因的显著下调。已知不受这些转录因子调节的Insig2基因不受该处理的影响(图33B)。

[0349] 还证明化合物19对人肝细胞癌细胞系(HePG2)的作用。如图34A-34B所示,化合物19产生高毒性水平,如由经处理的细胞的形态的显著变化和生长抑制所显示的。当用25 μ M化合物19处理HePG2细胞时,成熟和活性形式的水平显著减少,而SREBP-1前体增加,并且相应地,受SREBP控制的基因的表达水平增加(图34A-34B)。这些结果符合并支持化合物19通过抑制SREBP激活而作为脂肪生成的抑制剂的概念性作用。

[0350] 化合物19抑制人急性成淋巴细胞性白血病细胞系MOLT-4的生长

[0351] 将MOLT-4细胞在两种不同条件下生长:在5%胎牛血清(FBS)下和在5%FBS无脂肪血清(活性炭处理的血清)下。将10,000个细胞接种96孔板达24小时,然后开始用不同浓度的化合物19处理。向细胞中加入溶解在DMSO中的化合物19,持续48小时,然后用MTT测定确定细胞生长。如图35A所示,细胞在5%FBS和无脂肪FBS下的生长相似。在两种生长条件下,化合物19在10和20 μ M抑制约75-80%的细胞生长。这些结果表明,在10和20 μ M,甚至在外源性脂质存在下,化合物19同等有效,这表明从头脂质合成的抑制导致该癌症细胞系中的生长抑制。有趣的是,在无脂肪FBS下,在2和5 μ M化合物19的情况下,存在30-50%的生长抑制(图35C),并且在5%FBS条件下,以5 μ M存在强烈的抑制趋势(图35B)。

[0352] 化合物19抑制人多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226的生长

[0353] 将RPMI8226细胞在与MOLT-4细胞相同的条件下培养。将20,000个细胞接种到96孔板中达24小时,然后用增加浓度的化合物19处理,如关于MOLT-4细胞所述的。如图35D所示,细胞在5%FBS和无脂肪FBS下的生长相似,不同在于,与在5%FBS中的相对量相比,在5%FF FBS中的5 μ M化合物19抑制的生长约多1.5倍。在5%FBS和5%FF FBS中的10 μ M和20 μ M的化合物19的有效性相似。在5%FBS条件下在3 μ M(图35E)开始出现强烈的抑制趋势,并且在FBS无脂肪血清下在2 μ M(图35F)开始出现强烈的抑制趋势。

[0354] 实施例16

[0355] 化合物17抑制人急性成淋巴细胞性白血病细胞系MOLT-4的生长

[0356] MOLT-4细胞在两种不同条件下生长:在5%胎牛血清(FBS)下和在5%FBS无脂肪血清(活性炭处理的血清)下。将20,000个细胞接种在96孔板中达24小时,然后开始用不同浓度的化合物17处理。向细胞中加入溶解在DMSO中的化合物17,持续48小时,然后用MTT测定确定细胞生长。如图36A所示,5、10和20 μ M强烈抑制在5%FBS和5%无脂肪FBS下细胞的生长。在5%FF FBS下,3 μ M表现出的抑制是在5%FBS条件下的约2.5倍。在两种生长条件下,化

合物17在5、10和20 μ M抑制约85–100%的细胞生长。在5%FBS和5%FBS无脂肪血清下,从1 μ M开始都存在强烈的抑制趋势(图36B–36C)。

[0357] 化合物17抑制人多发性骨髓瘤细胞系RPMI的生长

[0358] RPMI8226在与MOLT-4细胞相同的条件下生长。将20,000个细胞接种到96孔板上达24小时,然后用增加浓度的化合物19处理,如关于MOLT-4细胞所述。如图36D所示,细胞在5%FBS和无脂肪FBS下的生长开始是相似的,不同在于,与在5%FBS中相对应量相比,在5%FF FBS中,5、10和20 μ M的化合物17抑制生长多约1.5–6倍。在5%FBS条件(图35E)和5%FBS无脂肪血清(图35F)下,从3 μ M开始,存在强烈的抑制。

[0359] 实施例17

[0360] 化合物19上调解偶联蛋白2 (UCP2) 并且减少体脂

[0361] SD雄性大鼠喂食Western饮食(高脂高碳水化合物(HFHC))3周后,所述饮食富含碳水化合物(35%kcal)和脂肪(45%kcal)。MTD研究的结果表明,最大有效剂量可能为或低于100mg/kg。因此,选择100mg/kg的1/40和1/10用于效果研究。将喂食HFHC饮食的大鼠分成四组,每组15只动物:(1)不接受任何处理的对照组;(2)给予1ml棉籽油的对照组;(3)用2.5mg/kg化合物19处理的实验组;(4)用10mg/kg化合物19处理的实验组。最后,一组(n=5)喂食常规大鼠饲料(RD)。

[0362] 化合物19有效减轻体重和总体脂

[0363] 与喂食常规饲料的大鼠相比,喂食HFHC饮食三周使大鼠的总体重增加约12%,分别为 332 ± 6.5 相对于 375 ± 4.0 克(图37A)。如预期的,喂食常规饲料的大鼠的总体脂和%脂肪显著低于喂食HFHC饮食的那些(分别为 44.0 ± 2.5 相对于 62.4 ± 2.4 g/大鼠和 13.95 ± 0.5 相对于 18.48 ± 0.48 %)。与HFHC喂食的大鼠相比,RD喂食的大鼠中的瘦肉百分数也更高(图37B、37C和37D)。

[0364] 化合物19对体重和组成的作用

[0365] 每天确定体重,并且每2–3天测量一次食物摄入。从周日开始直到周五,给大鼠以在棉籽油中的化合物19达六天。基于施用药物和对照赋形剂的那天的体重计算剂量。如图38所示,在喂食HFHC饮食三周后并在开始处理之前,动物增重约200克(图38A)。喂食HFHC饮食但没有给予棉籽油的对照组和第二对照组(对照赋形剂)增重相似,这表明赋形剂对体重变化没有作用(图38B)。在开始处理两周后,在2.5mg/kg和10mg/kg处理的组中,体重显著下降。在八周处理结束时,与对照赋形剂相比,2.5mg/kg少增重约15%(分别为 357.7 ± 10.4 g/大鼠相对于 420.9 ± 2.4 g/大鼠)(图38A)。在10mg/kg处理的大鼠中,体重增加下降得更多,比对照赋形剂组低约24%(分别为 321.4 ± 10.3 g/大鼠)。累计的食物摄入在对照和2.5mg/kg组之间相似(分别为 1370 ± 21 相对于 1320 ± 18 g/大鼠),并且在10mg/kg组中略微减少(1245 ± 21 ,见图2B)。当相对于食物摄入计算总体重增加比率时,与对照相比,在2.5和10mg/kg组中增加的体重少约13%和16%(分别为 0.326 ± 0.011 , 0.313 ± 0.014 相对于 0.373 ± 0.011)。在不存在减少的食物摄入的条件下,在2.5mg/kg组中减轻的体重可以被解释为意味着所述药物在不减少食物摄入的情况下减轻体重,如在ob/ob小鼠中观察到的。

[0366] 重量增加的减少主要是由于较低的体脂

[0367] 为了确定化合物19对减少总体脂组成的作用,使用ECHOMRI法每两周确定一次身体组成。在处理两周后,用2.5和10mg/kg处理的大鼠的总体重低于对照和对照赋形剂组(图

39A)。这一减少主要是由于较低的体脂,而瘦体重没有显著变化(图39B)。处理八周后,2.5和10mg/kg处理的大鼠的体重比对照组低8%和15%(分别为 545.6 ± 9.7 , 502.8 ± 7.8 和 592.9 ± 5.4 g/大鼠,见图39A)。10mg/kg组的体重达到与喂饲常规饮食的大鼠相似的值。更重要的是,体重的差异可以主要归因于处理组和对照组之间脂肪含量的不同(图39B)。处理八周后,与对照-赋形剂相比,2.5和10mg/kg中,总体脂重量低约25和43%(分别为 114.7 ± 5.2 , 86.5 ± 3.2 和 150.9 ± 4.2 gr/大鼠)。总%脂肪也显著更低,其中2.5mg/kg组具有与喂饲常规饮食的大鼠组相似的%脂肪,并且10mg/kg组具有比常规饮食更低的百分数; 26.6 ± 0.53 (对照组); 21.9 ± 0.82 (2.5mg/kg组); 18.0 ± 0.6 (10mg/kg)和 21.2 ± 0.82 (常规饮食)(图39C)。尽管与对照组的瘦体重百分数相比,2.5和10mg/kg中的瘦体重百分数更高,但是,在所有组之间,瘦体重没有显著区别(图39D和39E)。

[0368] 化合物19改善由HFHC饮食导致的脂肪肝病况并且下调从头脂肪生成的基因表达并且潜在地是通过上调解偶联蛋白和生热作用

[0369] 用高脂肪饮食喂饲Sprague-Dawley大鼠不仅诱导肥胖,还引起脂肪肝病况,在这些肝脏中积聚高水平的甘油三酯。在处理八周后,检验化合物19对喂饲HFHC饮食的SD大鼠的肝脏的作用。如图40A所示,与处理的大鼠相比,对照大鼠发展了更大更肥的肝脏。这进一步通过用Oil Red O染色法染色来自每组五只动物的冷冻的肝脏切片证实,其中,与对照相比,所有处理组(n=5)中的脂肪蓄积都更低(图40B)。这些结果通过确定对照和处理大鼠中的TG和胆甾醇水平证实。如图40C所示,在两个处理的动物组中,TG和胆甾醇水平分别低40和25%(图40C)。使用实时PCR法,我们发现受SREBP-1控制的基因(ACC、SCD和ACL)和受SREBP-2控制的基因(MVD、LDLR和INSIG-1)被显著下调40-80%(图40D)。这些结果表明,化合物19不仅减少总体脂,而且改善脂肪肝病况,并且是有希望的治疗人脂肪肝疾病的药物。

[0370] 在用化合物19处理的大鼠肝脏中解偶联蛋白2(UCP2)的上调

[0371] 充分证明了UCP参与生热作用的上调。它们通过降低线粒体膜电势而将代谢能作为热量消散。肝脏是非常活跃的代谢器官,尤其是在脂质合成中。本发明已经表明,在对照和用化合物19处理的大鼠之间的食物消耗没有显著差异。尽管喂饲脂肪生成性饮食,处理的动物仍然蓄积显著更低的体脂,包括肝脏。检验肝脏,将其作为能量可能解偶联的实例,并且确定肝脏中的UCP2(主要的UCP)的水平。如图41所示,使用实时PCR法,在2.5和10mg/kg处理的组中,UCP2水平显著更高,分别增加约1.5和3倍。这些结果强烈表明,肝脏中脂质含量的减少是由于减少的合成和解偶联导致,其中能量部分通过解偶联的生热作用消散。

[0372] 本文引用下述参考文献。

[0373] Abu-Elheiga等人,(2001)Science(科学)291,2613-6.

[0374] Abu-Elheiga,L.等人,(2003)Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院学报)100,10207-12.

[0375] Abu-Elheiga,L.等人,(1997)J Biol Chem(生物化学杂志)272,10669-10677.Abu-Elheiga,L.等人,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报)97,1444-1449.

[0376] Abu-Elheiga,L.等人,(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报)92,4011-4015.

[0377] Boden G,C.X.等人,(1994)J Clin Invest.(临床研究杂志)93(6):2438-4693

(6), 2438-2446.

- [0378] Boizard,M.等人, (1998) J Biol Chem(生物化学杂志) 273,29164-71.
- [0379] Brown,M.S.等人, (1997) Cell(细胞) 89,331-40.
- [0380] Chalkley,S.M.等人, (1998) Metabolism(代谢) 47 (9) ,1121.
- [0381] Choi,Y.等人, (2003) J Biol Chem(生物化学杂志) 278,7320-4.
- [0382] Cohen,P.等人, (2002) Science(科学) 297 (5579) ,240-243.
- [0383] Goldstein,J.L.等人, (1983) Methods Enzymol(酶学方法) 98,241-60.
- [0384] Goldstein,J.L.等人, (2006) Cell(细胞) 124,35-46.
- [0385] Grand-Perret,T.等人, (2001) Nat Med(自然医学) 7,1332-8.
- [0386] Hastings,N.等人, (2001) Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院学报) 98 (25) ,14304-14309.
- [0387] Hookman等人, (2003) American Journal of Gastroenterology(美国胃肠病学杂志) 98 (9) ,2093-2097.
- [0388] Horton,J.D.等人, (1998) Proc Natl Acad Sci USA(美国国家科学院学报) 95, 5987-92.
- [0389] Horton,J.D.,等人, (2003) Proc Natl Acad Sci USA(美国国家科学院学报) 100, 12027-32.
- [0390] Horton,J.D.等人, (2003) J.Biol.Chem.(生物化学杂志) 278 (38) ,36652-36660.
- [0391] Hua,X.等人, (1996) Cell(细胞) 87,415-26.
- [0392] Hua,X.等人, (1995) J Biol Chem(生物化学杂志) 270,29422-29427.
- [0393] Ingalis,A.M.等人, (1950) J.Hered(遗传学杂志) 41,317-318.
- [0394] Kim,J.B.等人, (1996) Genes Dev(基因发育) 10,1096-107.
- [0395] Ktorza A,B.C.等人, (1997) Diabetes Metab.Suppl(糖尿病代谢增刊) 2,38-46.
- [0396] Kubota N,T.Y.,等人. (1999) Mol.Cell(分子生物学) 4,597-609.
- [0397] Liang,G.,等人, (2002) J Biol Chem(生物化学杂志) 277,9520-8.
- [0398] Mao,J.等人, (2006) Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院学报) 103, 8552-7.
- [0399] Marquardt,A.,等人, (2000) Genomics(基因组学) 66 (2) ,175.
- [0400] Matsusue,K.,等人, (2003) J.Clin.Invest.(临床研究杂志) 111 (5) ,737-747.
- [0401] Miyazaki,M.,等人, (2000) J.Biol.Chem.(生物化学杂志) 275 (39) ,30132-30138.
- [0402] Moller,D.E.等人, (2005) Annual Review of Medicine(医学年度综述) 56 (1) , 45-62.
- [0403] Nakamura,M.T.等人, (2004) Annual Review of Nutrition(营养学年度综述) 24 (1) ,345-376.
- [0404] Ntambi,J.M.,等人, (2002) Proc Natl Acad Sci USA(美国国家科学院学报) 99 (17) ,11482-11486.
- [0405] Oh,W.,等人, (2005) Proc Natl Acad Sci U S A(美国国家科学院学报) 102, 1384-9.
- [0406] Osborne,T.F. (2000) J Biol Chem(生物化学杂志) 275,32379-82.

- [0407] Rader,D.J. (2001) Nat Med (自然医学) 7,1282-4.
- [0408] Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药典),第18版.Mack Printing Company,1990.
- [0409] Sakai,J.等人,(1996) Cell (细胞) 85,1037-46.
- [0410] Sakai,J.等人,MMol Cell 2,505-14 (1998) .
- [0411] Sato,S.等人,J Am Chem Soc 129,873-80 (2007) .
- [0412] Sheng,等人,(1995) Proc Natl Acad Sci U S A (美国国家科学院学报) 92,935-938.
- [0413] Shimano,H. (2000) Trends Cardiovasc Med (心血管医学趋势) 10,275-8.
- [0414] Shimano,H.,等人,(1999) J Biol Chem (生物化学杂志) 274,35832-9.
- [0415] Tontono, P., 等人, (1993) Mol Cell Biol (分子细胞生物学) 13,4753-9.
- [0416] Yahagi,N., 等人, (2002) J.Biol.Chem. (生物化学杂志) 277 (22) ,19353-19357.
- [0417] Zambrowicz,B.P等人,(2003) Nat Rev Drug Discov. (自然药物发现综述) 2 (1) , 38-51.

序列表

<110> 贝勒医学院

<120> 用于治疗代谢和体重相关的病症的组合物和方法

<130> D7144CIPPCT

<141> 2014-08-29

<150> US 14/270,130

<151> 2014-05-05

<150> US 14/052,074

<151> 2013-10-11

[0001]

<150> US 14/013,918

<151> 2013-08-29

<160> 27

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于低密度脂蛋白受体的引物

<400> 1

tcagaccggg actgcttgga cggctcagtc 30

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于低密度脂蛋白受体的引物

<400> 2

ccacttaggc agtggaactc gaaggccg 28

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 用于硬脂酰辅酶A去饱和酶的引物

<400> 3

gcctgcttga taatatataa a 21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于硬脂酰辅酶A去饱和酶的引物

<400> 4

cacttgaatt gagcttttag 19

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于ATP柠檬酸裂解酶的引物

<400> 5

aagaaaaagt gtcagacagc tgg 23

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于ATP柠檬酸裂解酶的引物

<400> 6

tggactgaag ggggtgtagc 20

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶的引物

[0003]

<400> 7

gcccgcacagt tctgaactgg aaca 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶的引物

<400> 8

gaacctgaga cctctctgaa agag 24

[0004]

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于甲羟戊酸激酶的引物

<400> 9

ctgcctgact gectcagc 18

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于甲羟戊酸激酶的引物

<400> 10

acctctcctg acacctggg 19

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于胰岛素诱导基因1的引物

<400> 11

aagacttcag ggtaagtcac ca 22

[0005]

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于胰岛素诱导基因1的引物

<400> 12

cgtgtataat ggtgtctatc ag 22

<210> 13

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 来源于SREBP-1基因的寡核苷酸

<400> 13

gatccccgcc acattgagct cctctcttca agagagagag gagctcaatg 50

tggcttttttg gaaa 64

<210> 14

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 来源于SREBP-1基因的寡核苷酸

[0006] <400> 14

agcttttcca aaaagccaca ttgagctcct cctctctttg aaggaggagc 50

tcaatgtggc ggg 63

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 聚脯氨酸接头序列

<400> 15

Lys Pro Gly Gln Phe Leu Tyr Glu Leu Lys Lys Pro Pro Pro Pro Pro

1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Lys Lys

20

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于低密度脂蛋白受体的引物

<400> 16

tcagaccggg actgcttgga cggctcagtc 30

<210> 17

<211> 25

[0007] <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于低密度脂蛋白受体的引物

<400> 17

cttaggcagt ggaactcgaa ggccg 25

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于硬脂酰辅酶A去饱和酶的引物

[0008]

<400> 18

gcctgcttga taatatataa ac 22

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于硬脂酰辅酶A去饱和酶的引物

<400> 19

cacttgaatt gagctttag 19

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于ATP柠檬酸裂解酶的引物

<400> 20

aagaaaaagt gtcagacagc tgg 23

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于ATP柠檬酸裂解酶的引物

<400> 21

tggactgaag ggggtgtagc 20

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶的引物

<400> 22

gcccgcacagt tctgaactgg aaca 24

<210> 23

[0009] <211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶的引物

<400> 23

gaacctgaga cctctctgaa agag 24

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶的引物

<400> 24

ctgcctgact gcctcagc 18

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶的引物

<400> 25

acctctcctg acacctggg 19

[0010]

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于胰岛素诱导基因1的引物

<400> 26

aagacttcag ggtaagtcac ca 22

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于胰岛素诱导基因1的引物

[0011]

<400> 27

cgtgtataat ggtgtctatc ag 22

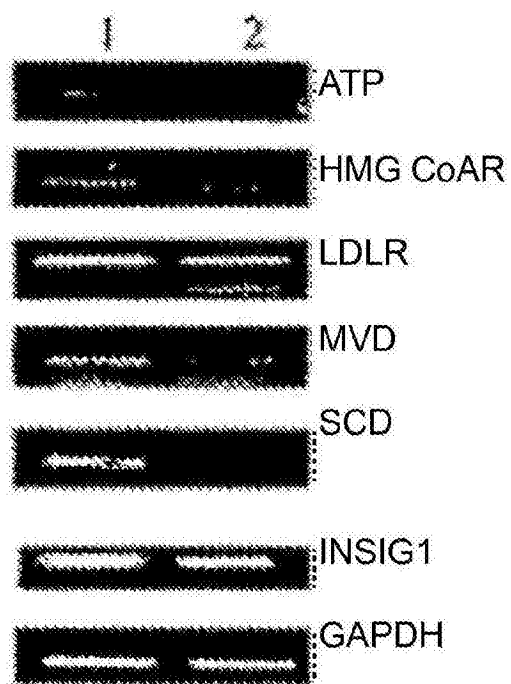


图1A

	减少的倍数	
	微阵列	RT-PCR
ATP	0.57	0.47
HMG CoAR	0.50	0.54
LDLR	0.61	0.58
MVD	0.32	0.50
SCD	0.57	0.47
INSIG1	0.32	0.64
GAPDH	1.00	0.92

图1B

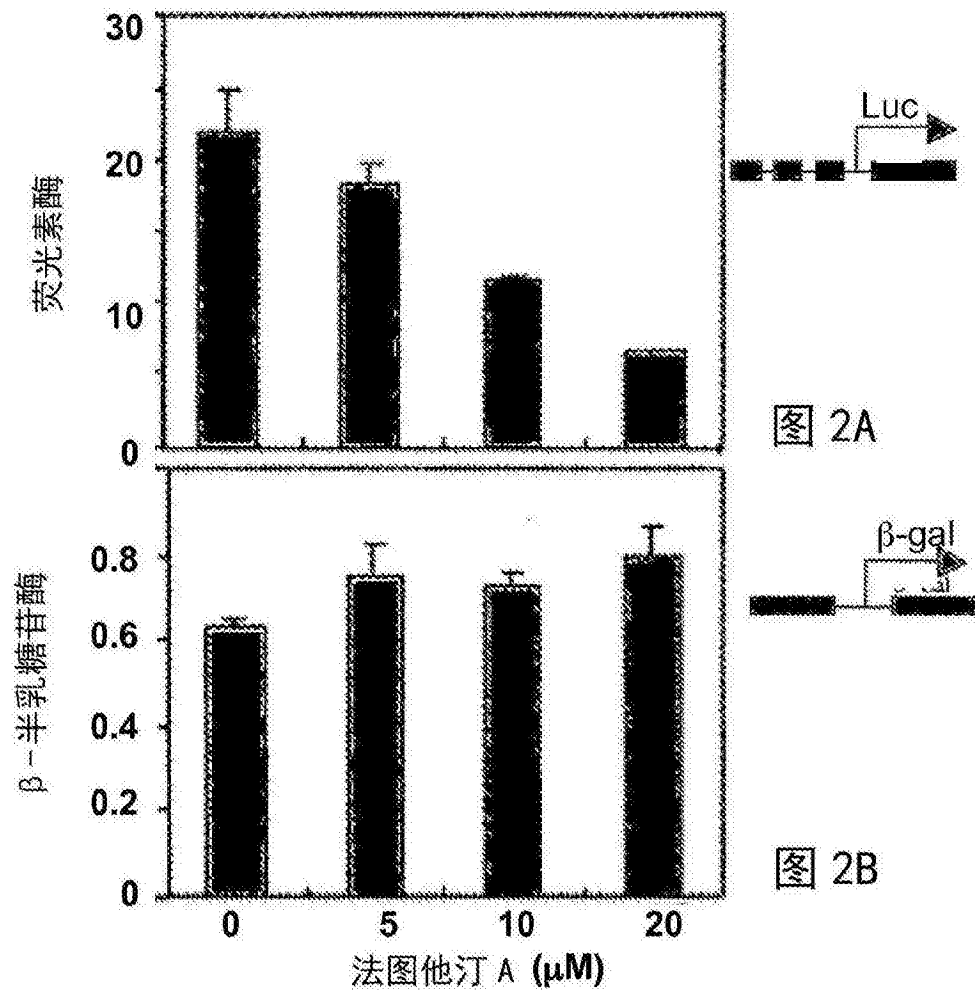


图 2A

图 2B

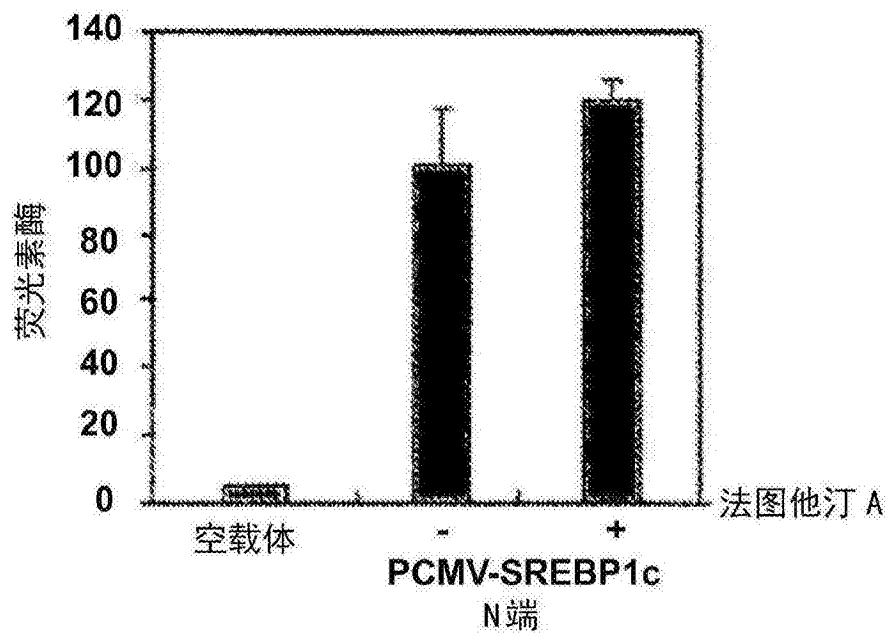


图2C

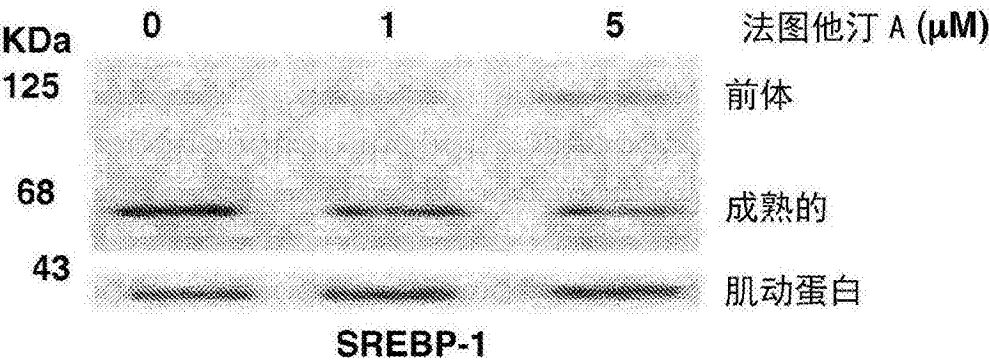


图3A

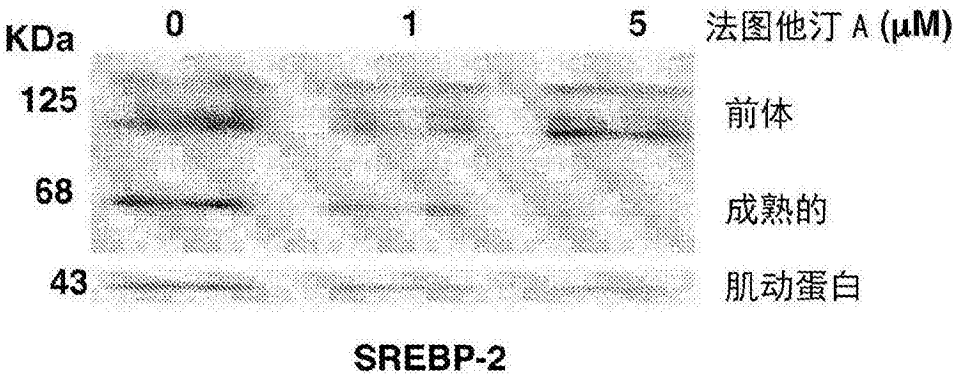


图3B

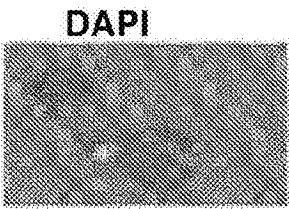


图3C

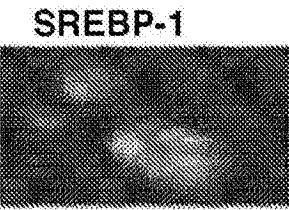


图3D

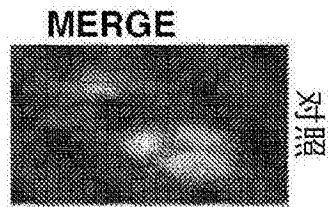


图3E

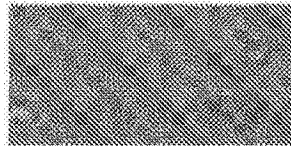


图3F



图3G

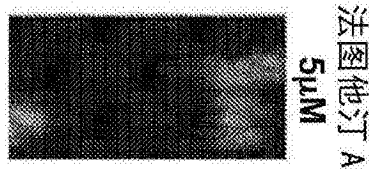


图3H

无

Neo

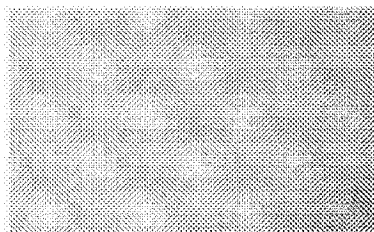


图4A

胰岛素

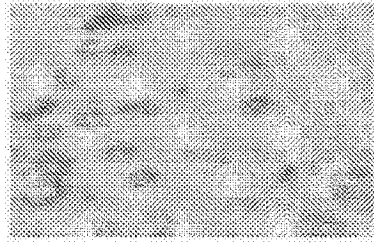


图4B

克隆 1

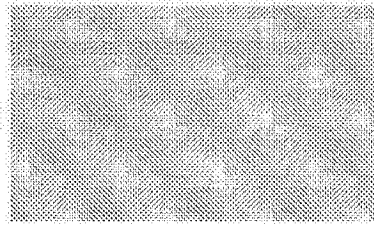


图4C

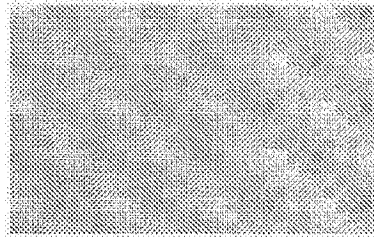


图4D

克隆 2

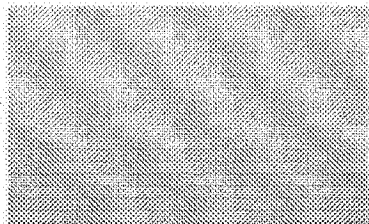


图4E

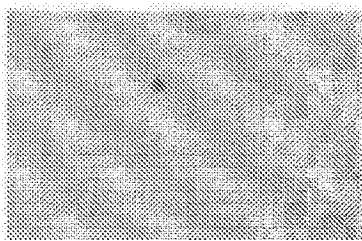


图4F

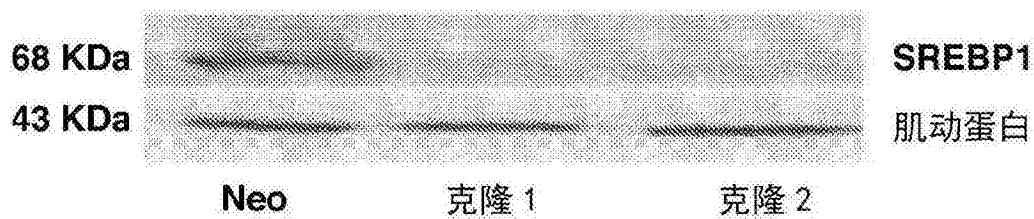


图4G

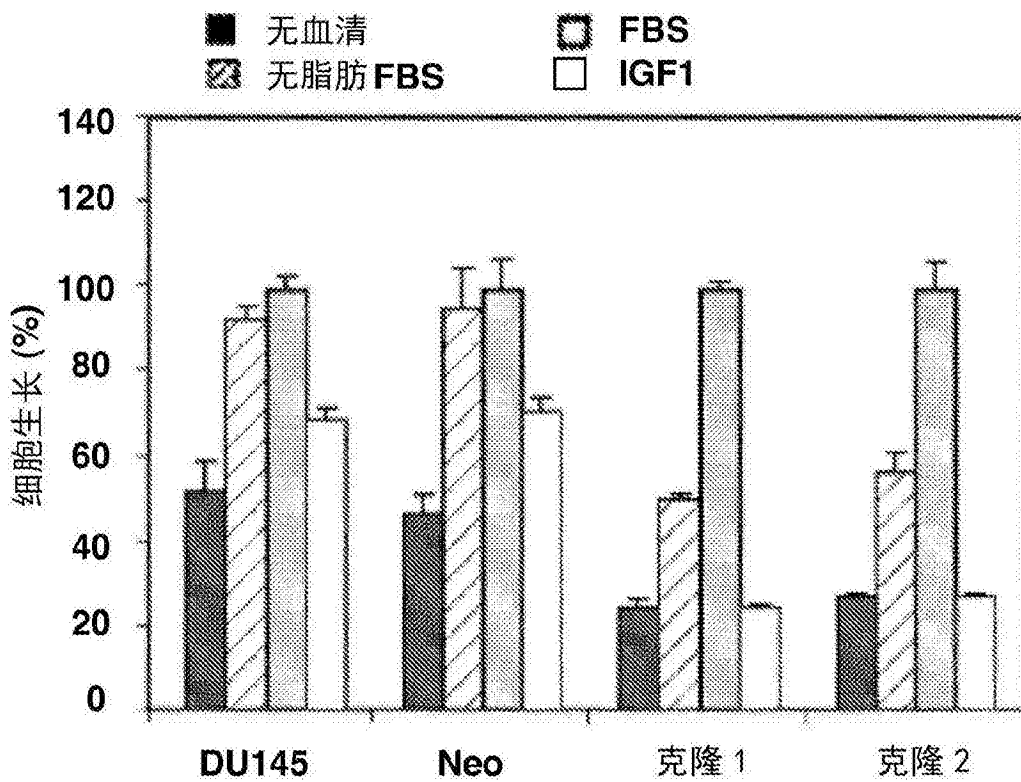


图5A

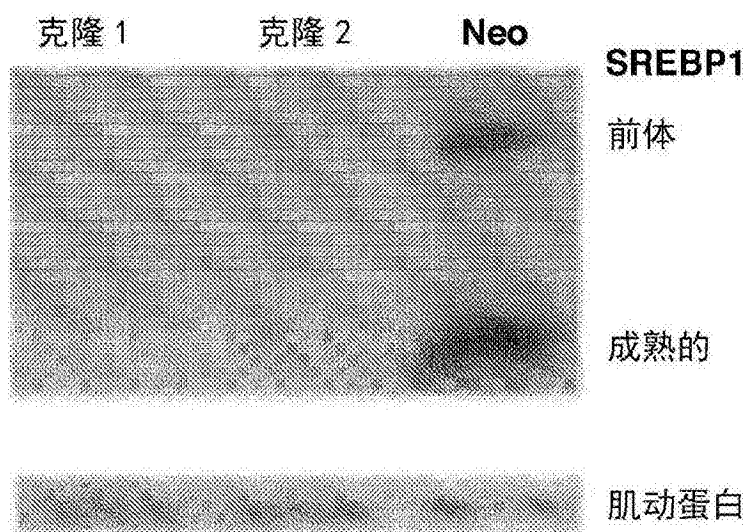


图5B

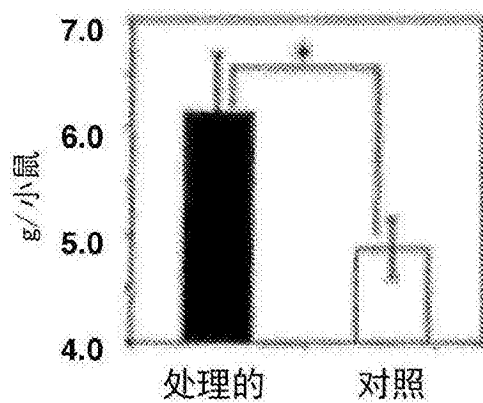


图6A

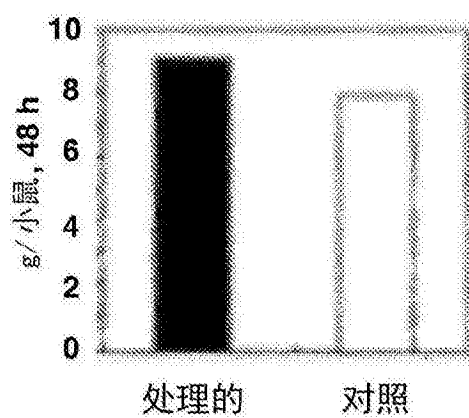


图6B

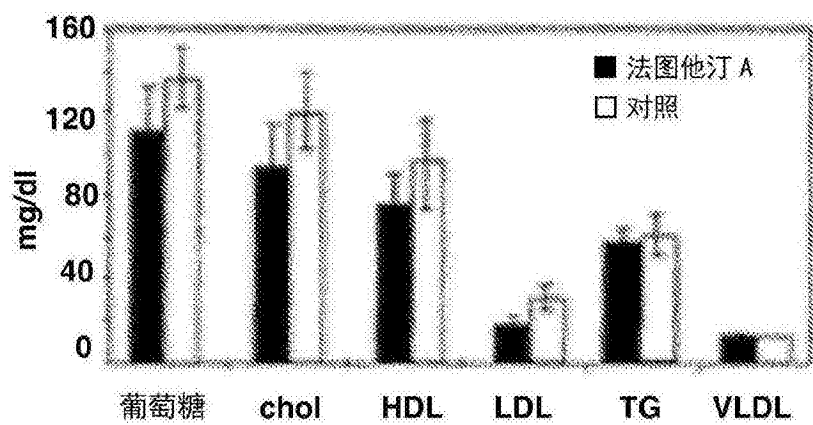


图6C

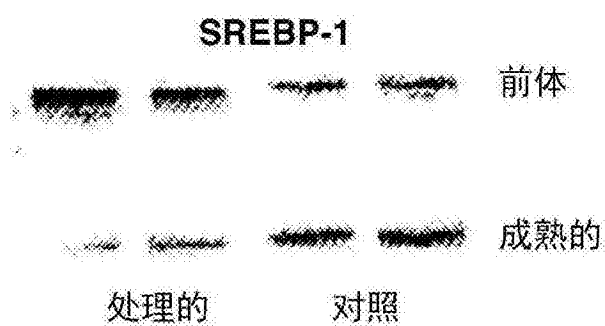


图6D

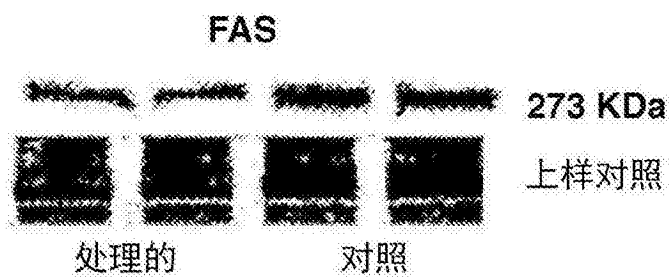


图6E

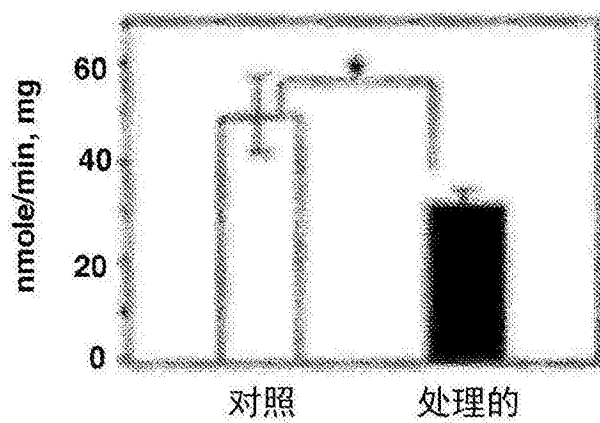


图6F

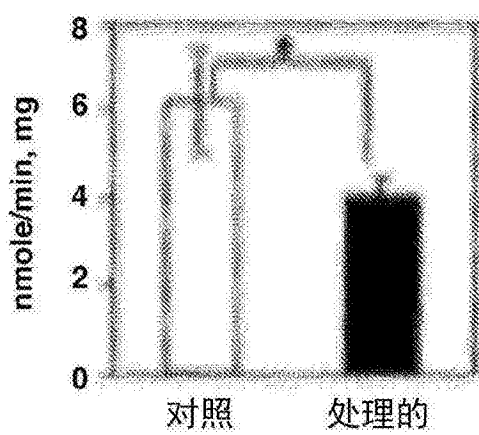


图6G

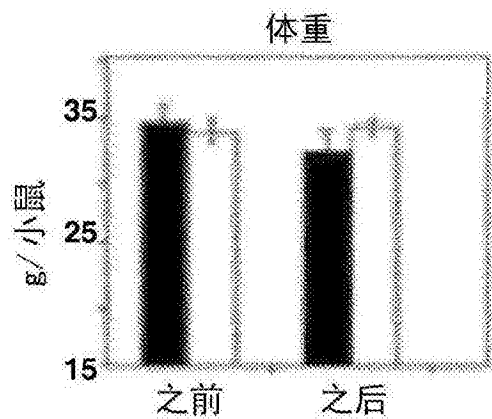


图 7A

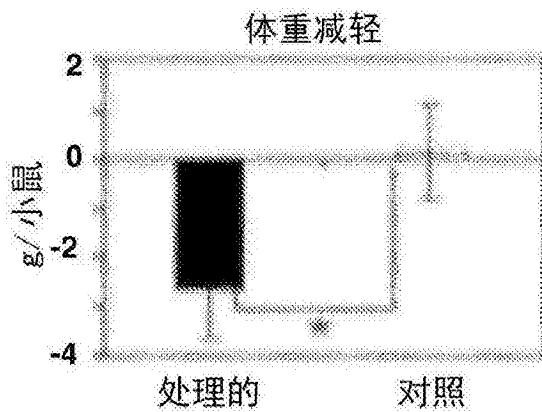


图 7B

■ 法图他汀 A
□ 对照

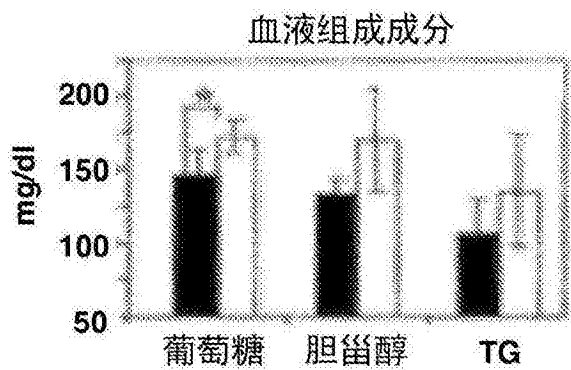


图 7C

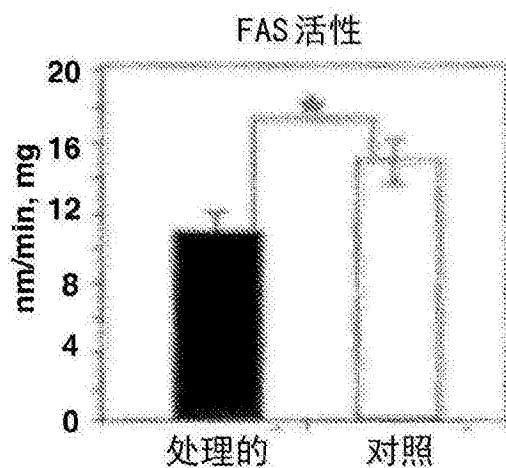


图 7D

FAS

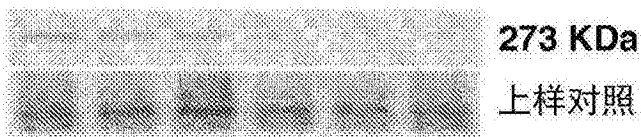
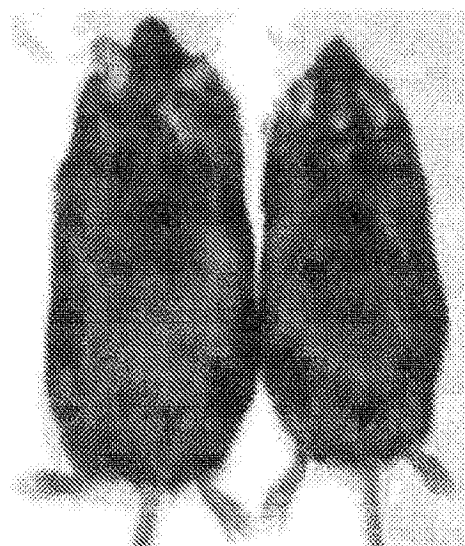


图 7E



对照

处理的

图8A

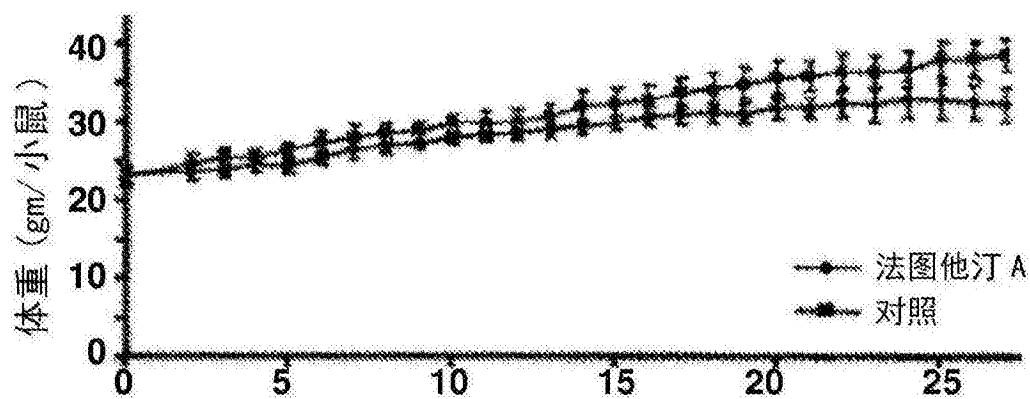


图8B

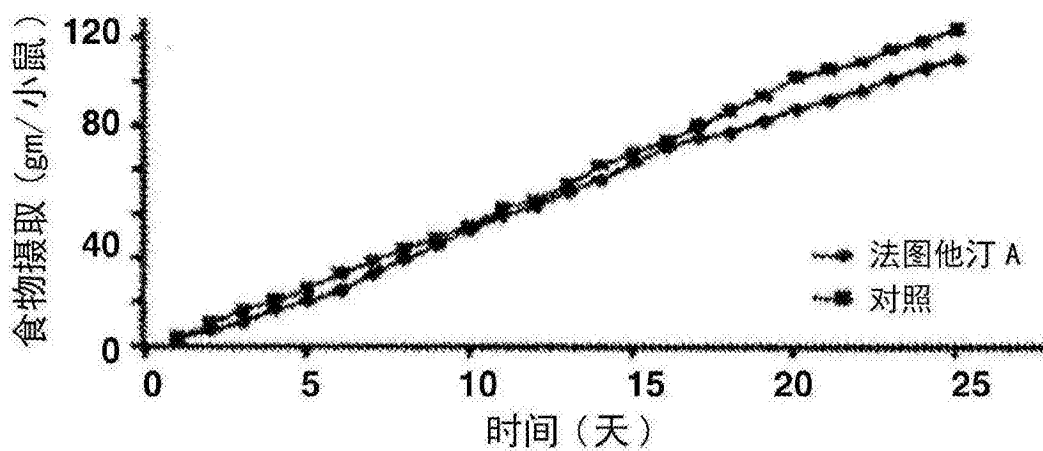


图8C

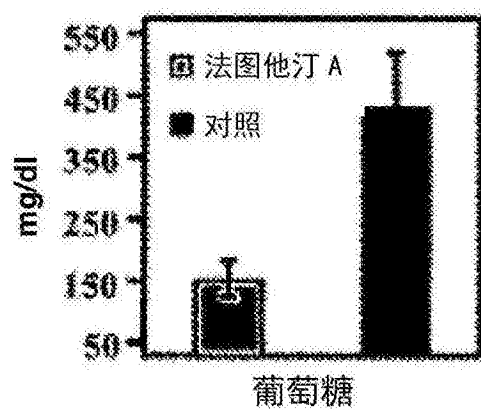


图9A

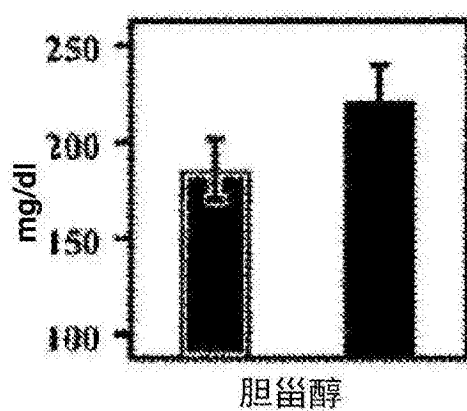


图9B

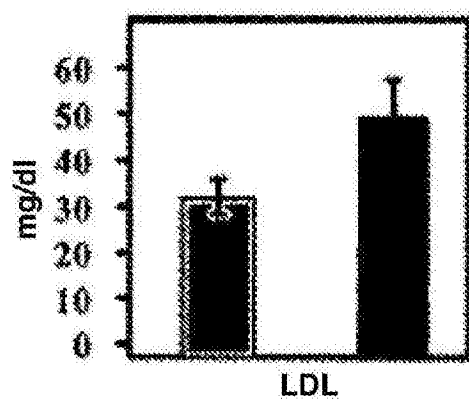


图9C

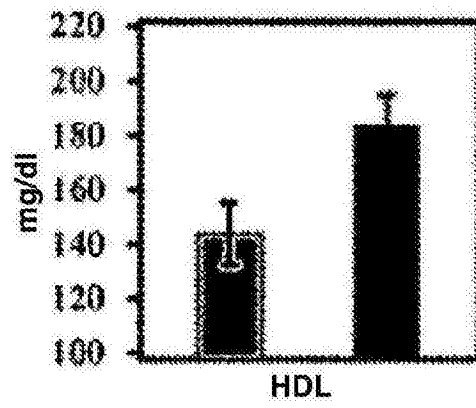


图9D

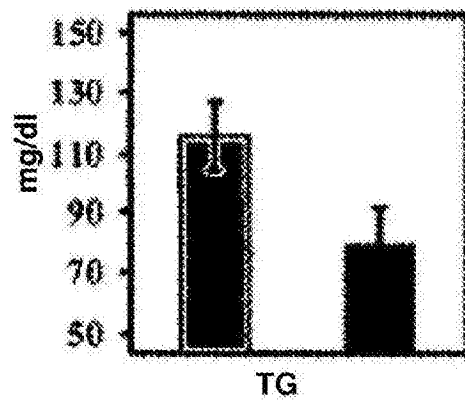


图9E

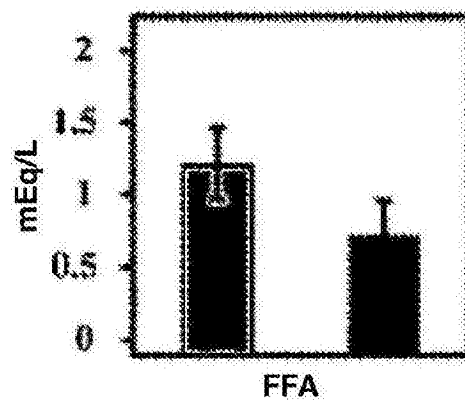


图9F

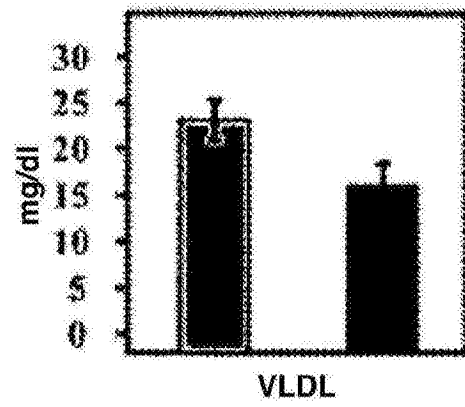


图9G

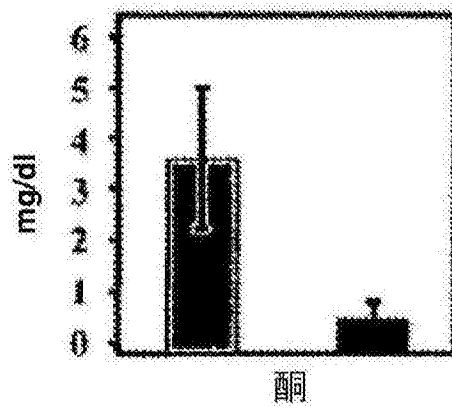
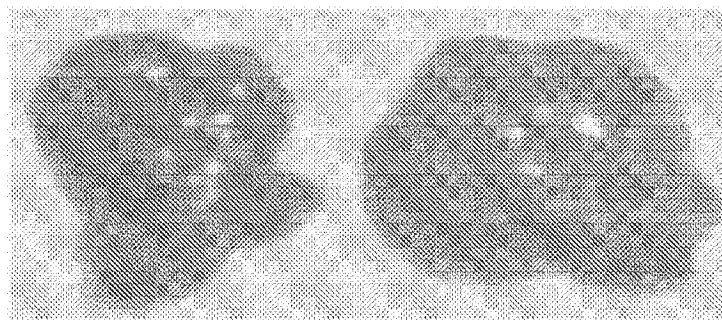


图9H

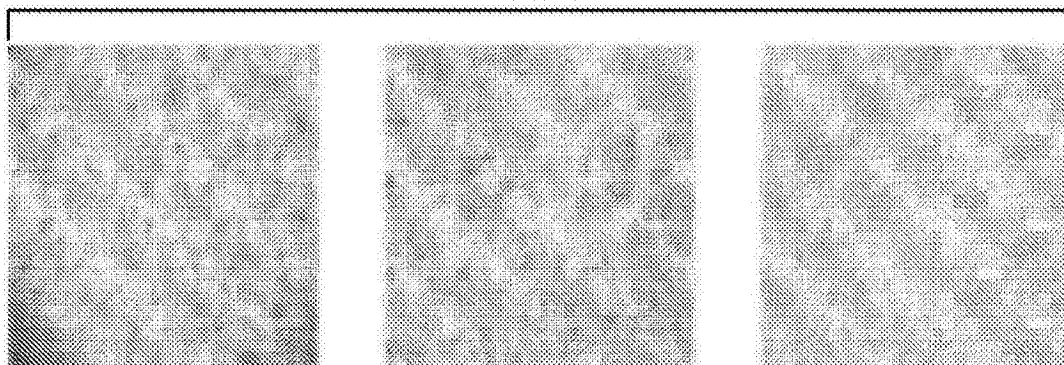


法图他汀 A

对照

图10A

法图他汀 A



对照

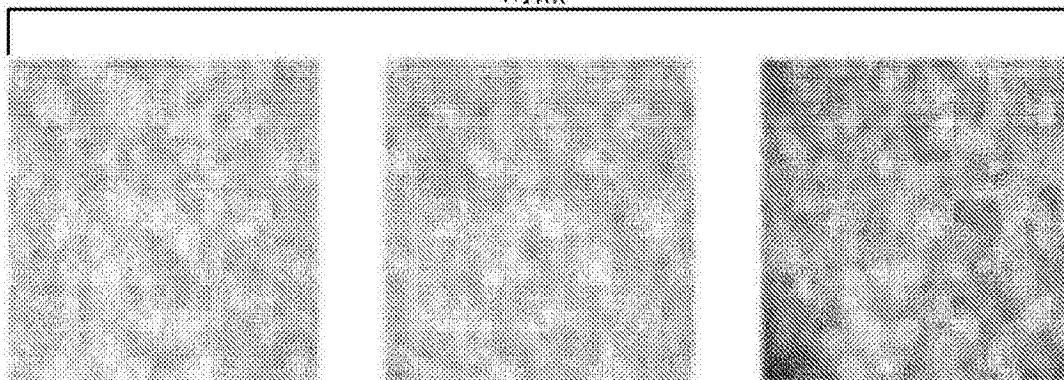


图10B

法图他汀 A

对照

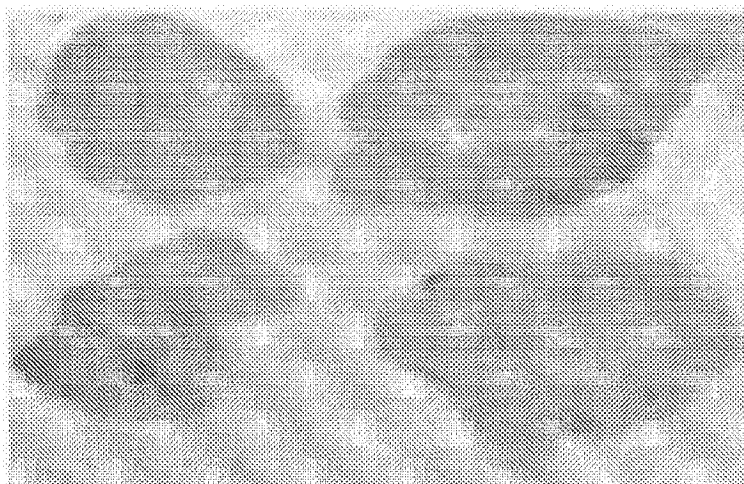


图10C

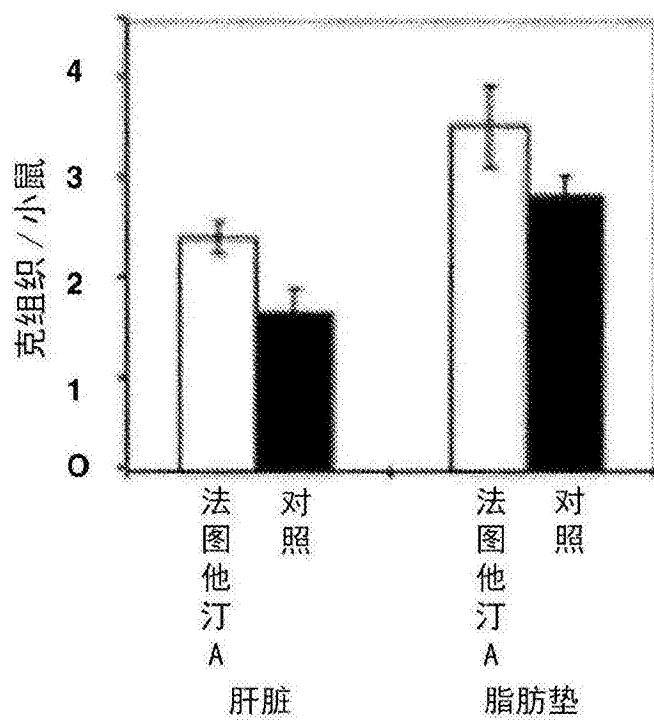


图10D

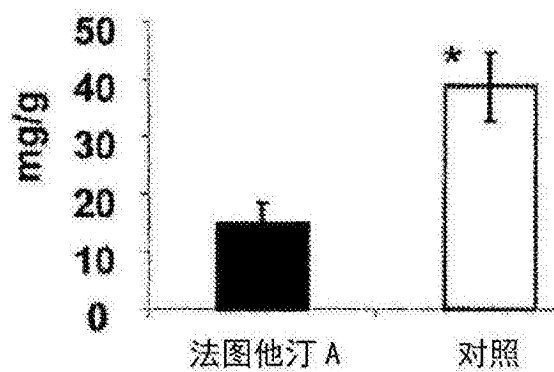


图11A

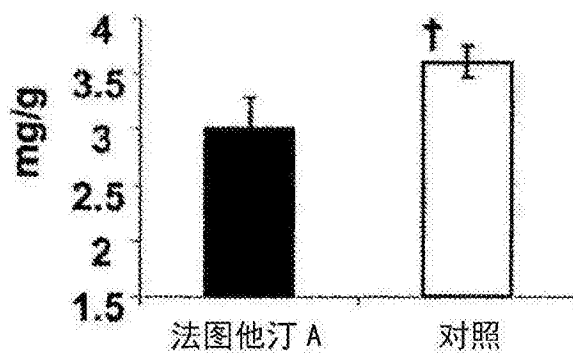


图11B

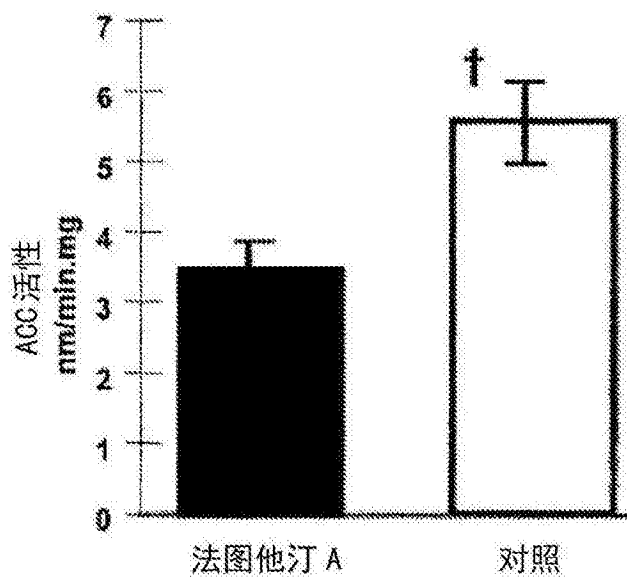


图12A

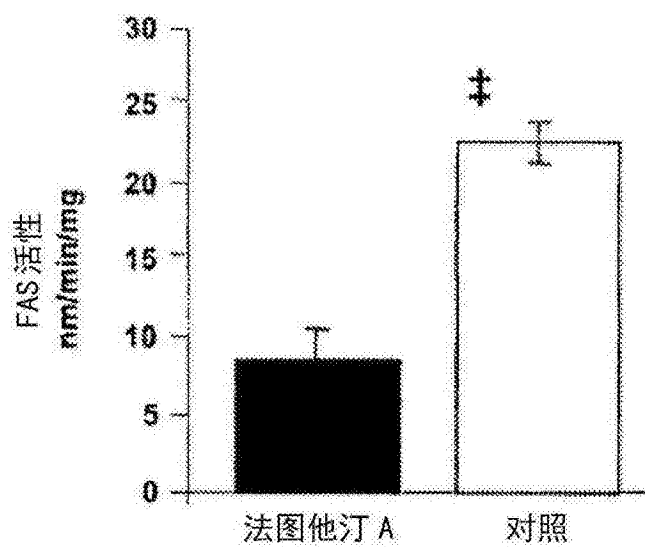


图12B

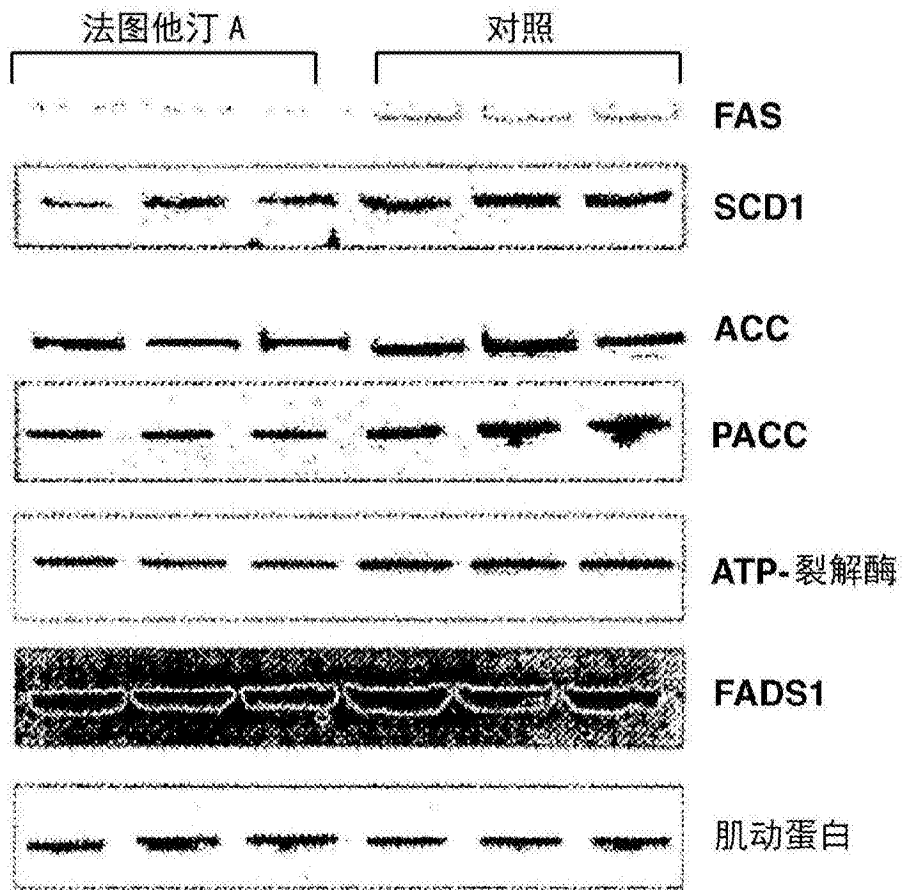


图12C

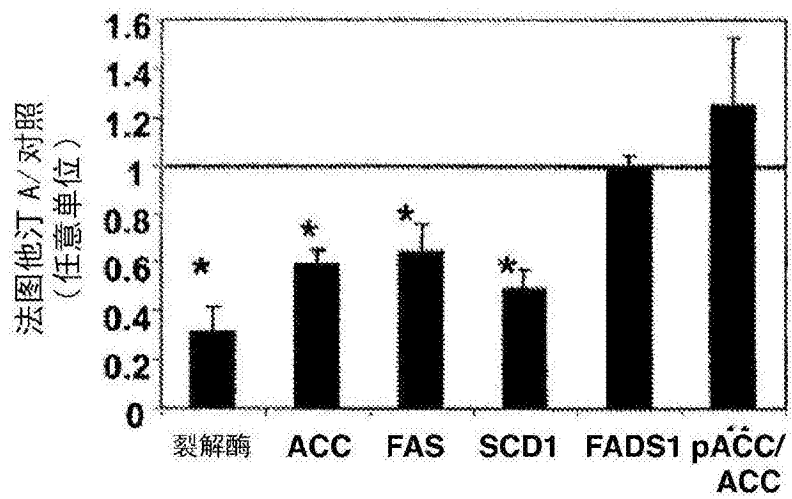


图12D

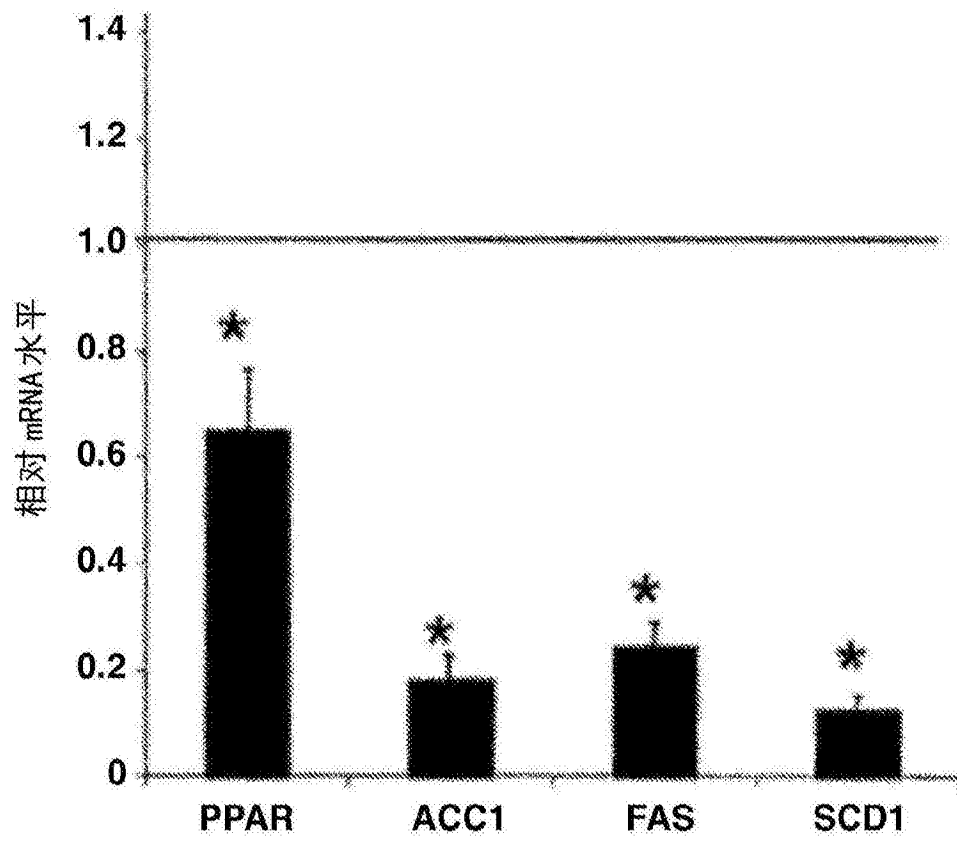
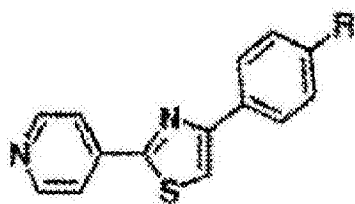
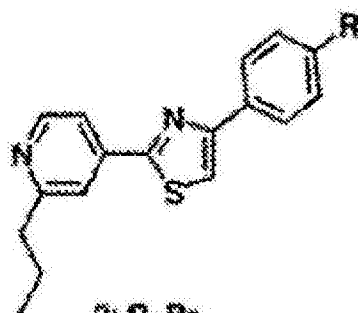
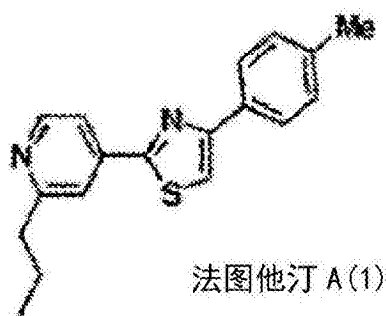
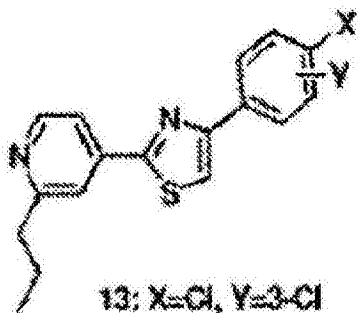
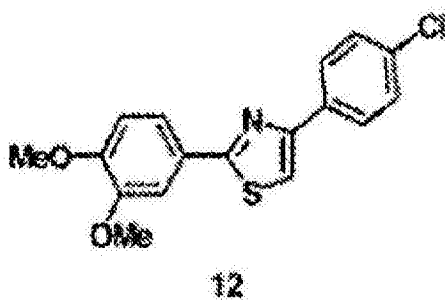


图13



5: R=Et
6: R=Me
7: R=OMe



13: X=Cl, Y=3-Cl
15: X=F, Y=2-F

2: R=Br
3: R=H
4: R=Cl
8: R=OBz
9: R=OH
10: R=OCH₂COOMe
11: R=OCH₂COOH
14: R=F
16: R=NH₂
17: R=NH-i-Pr
18: R=NHCOMe
19: R=NHSO₂Me
20: R=NHEn
21: R=NH
24: R=OMe
40: R=NH-Boc

41: R=NH-

42: R=NH-Ts

43: R=NH-

44: R=NH-

图14A

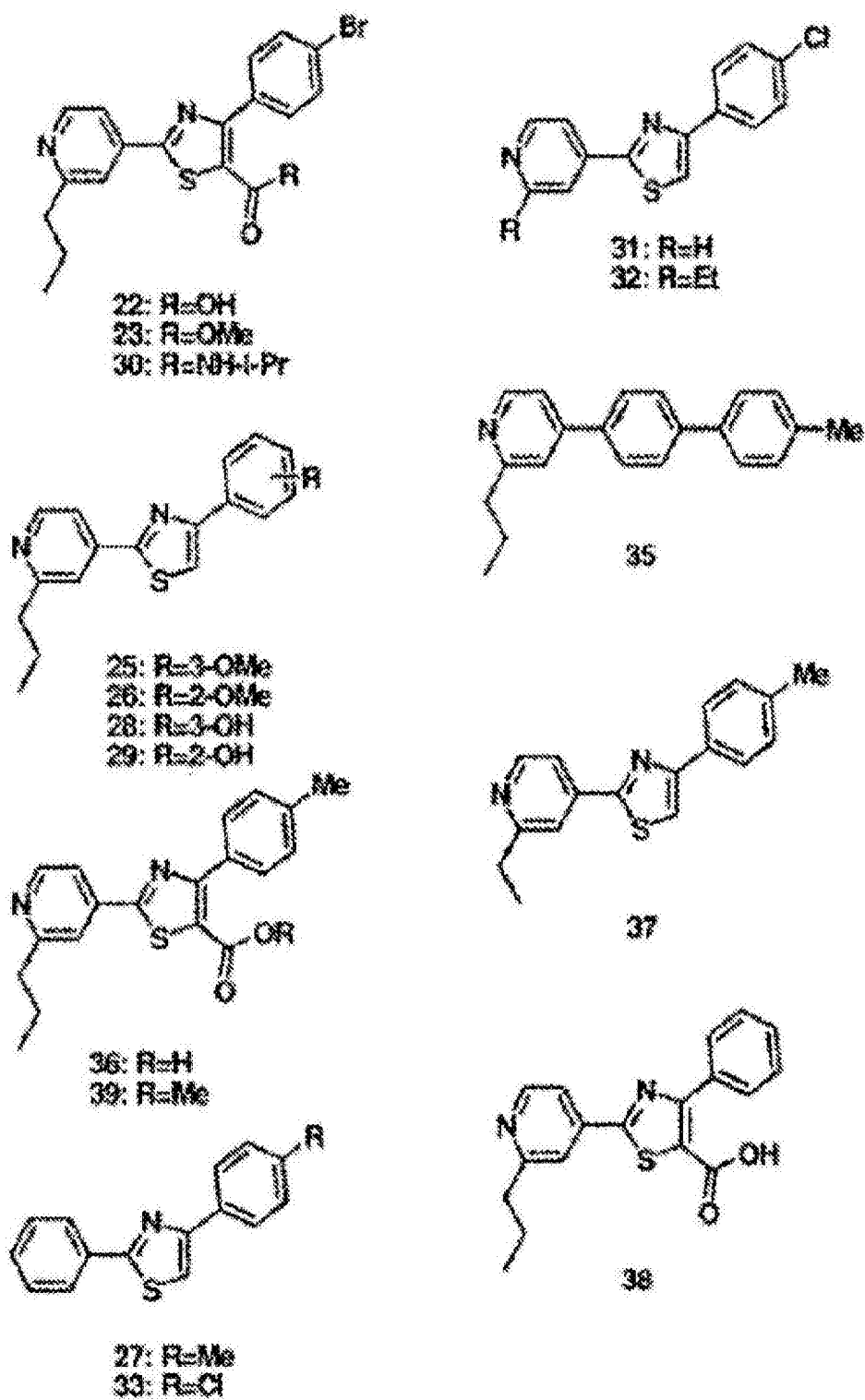


图14B

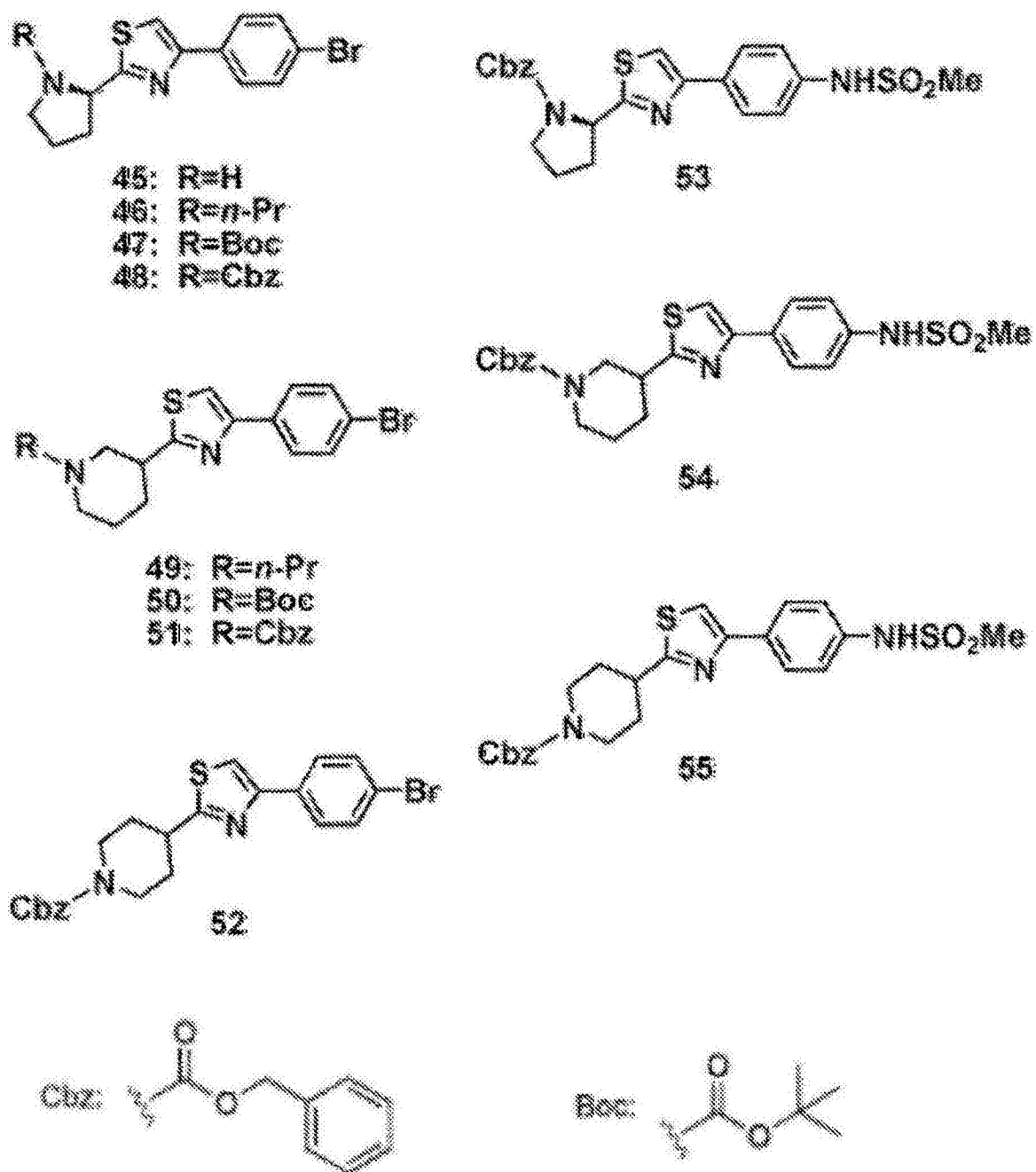


图14C

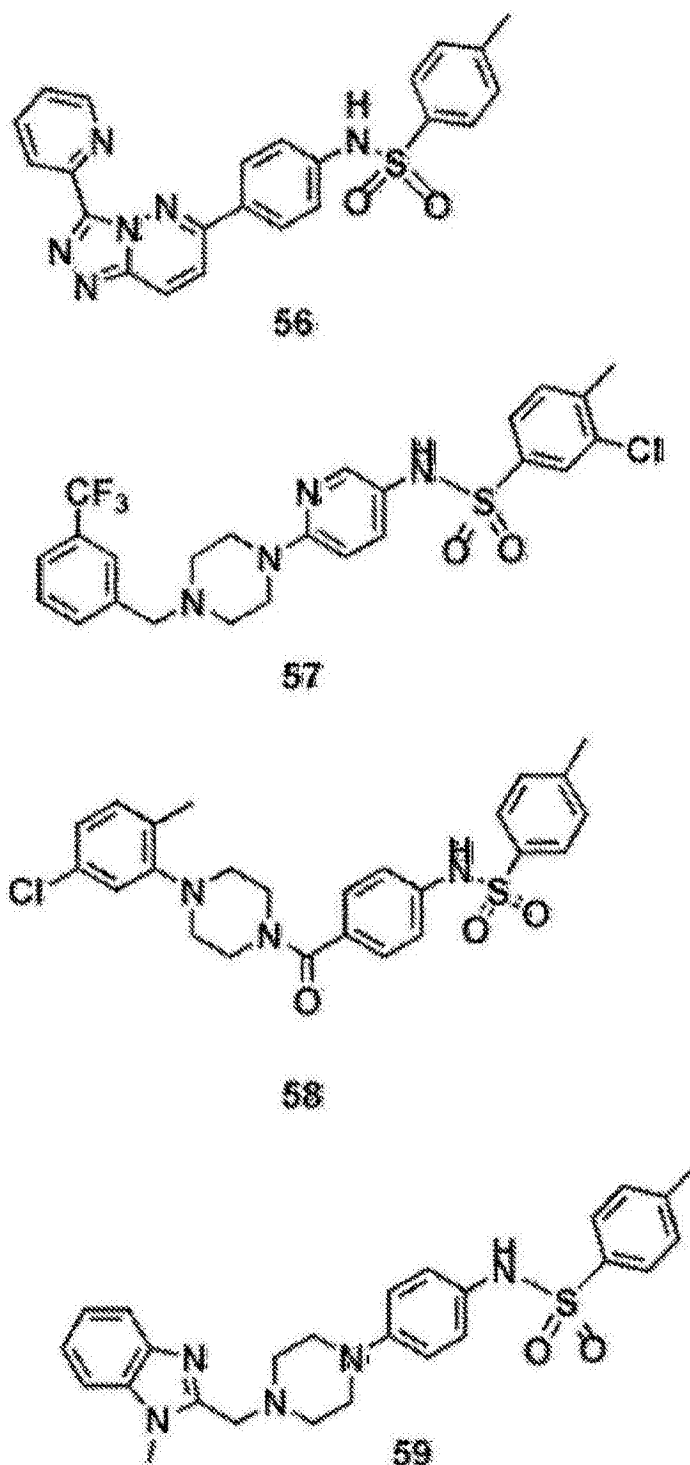


图14D

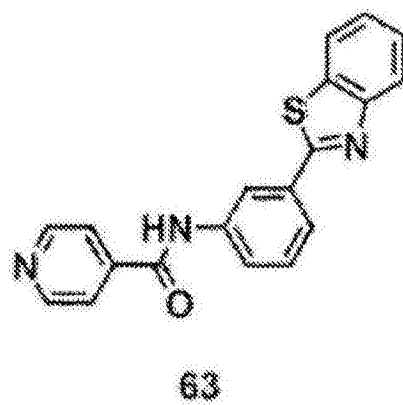
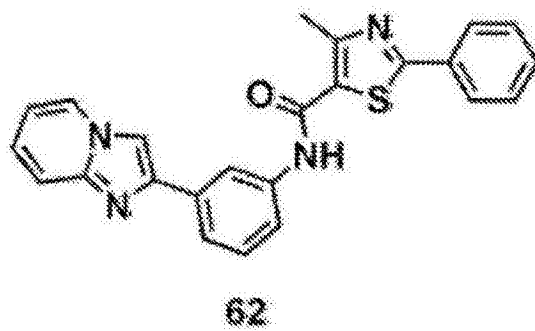
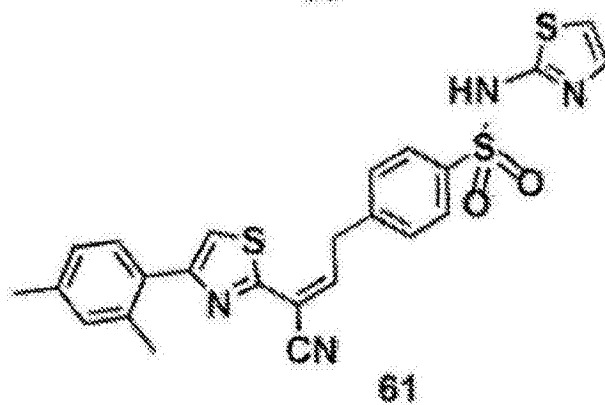
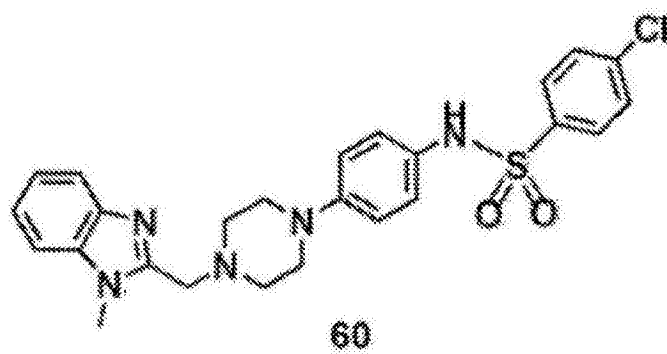
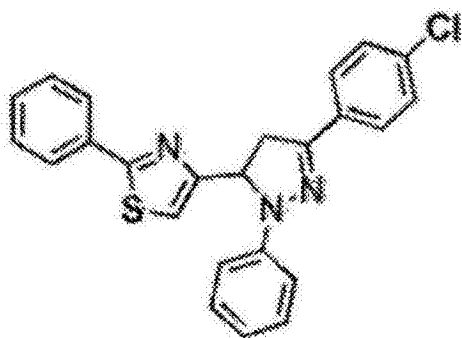
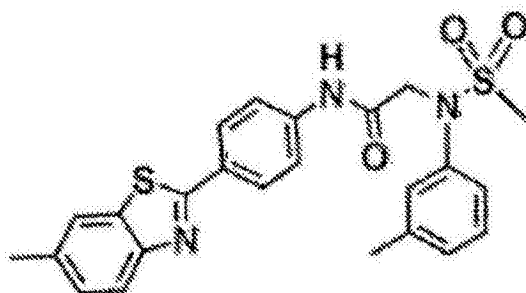


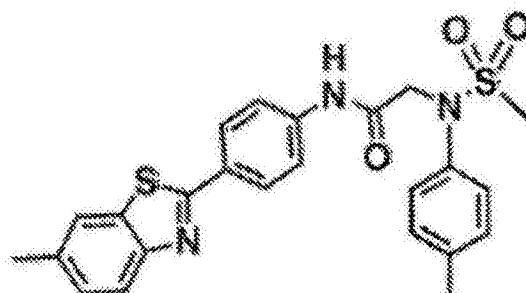
图14E



64



65



66

图14F

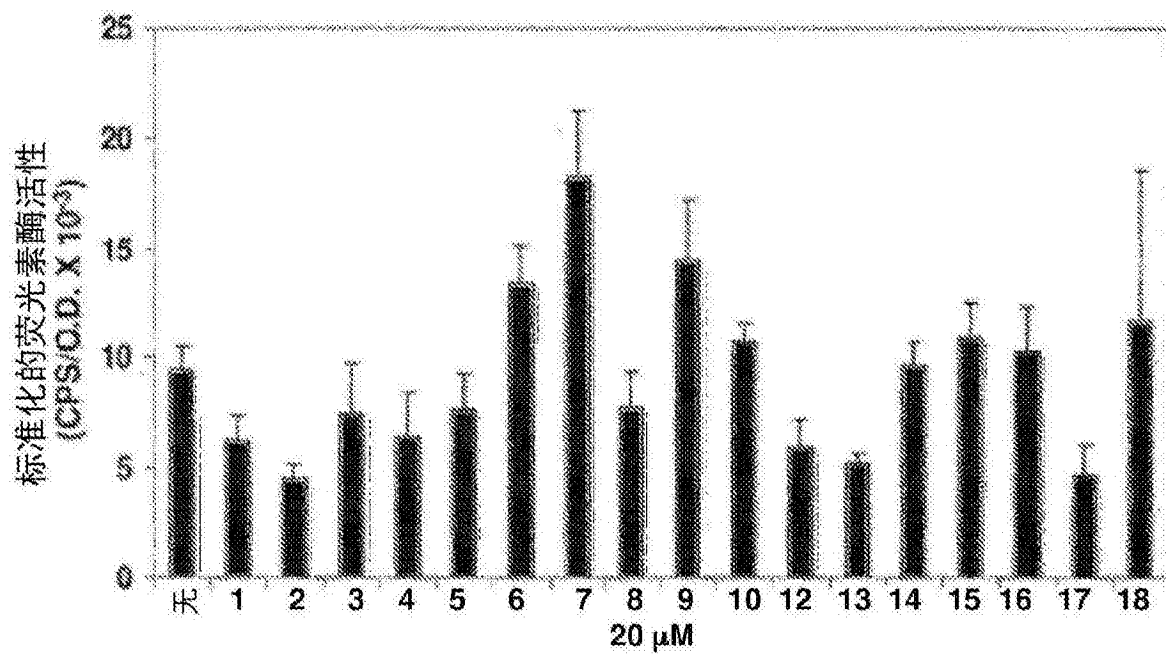


图15

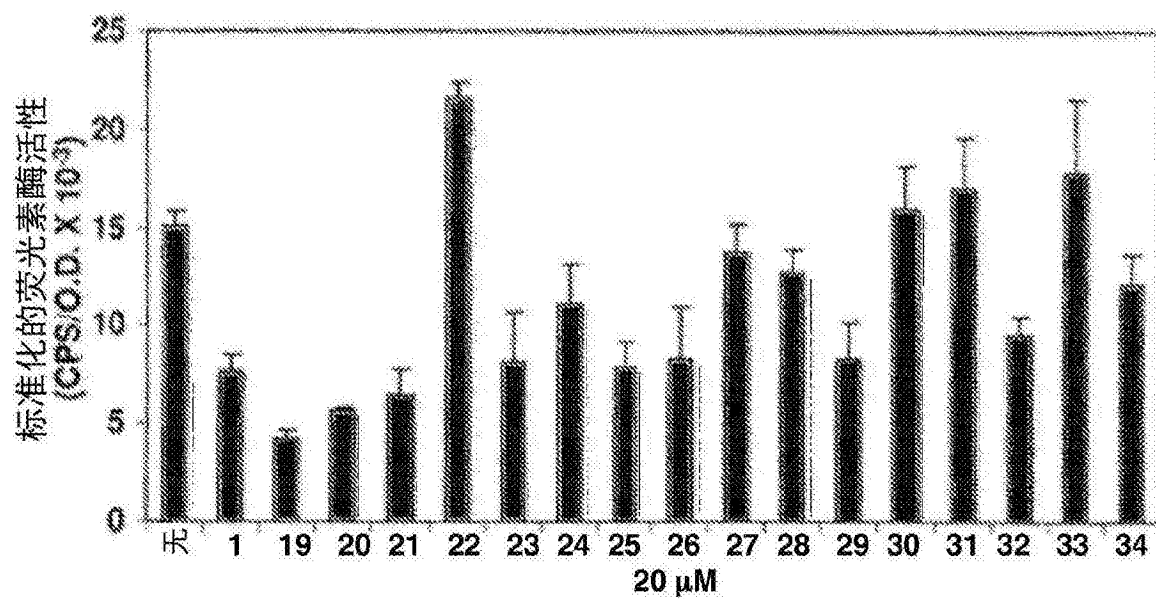


图16

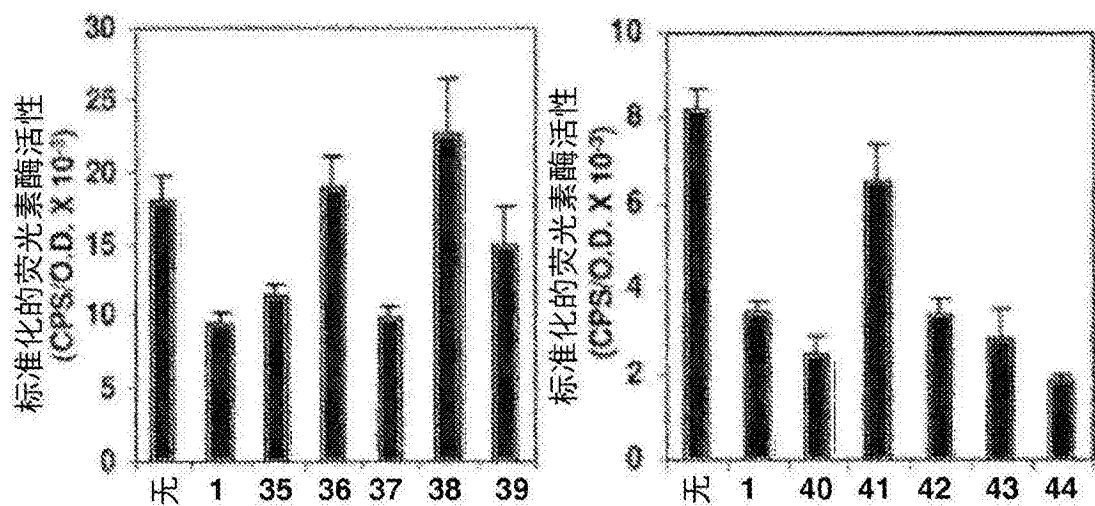


图17

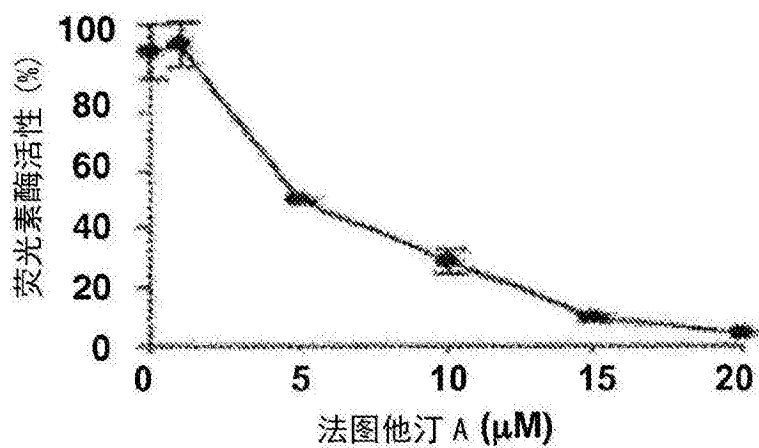


图18A

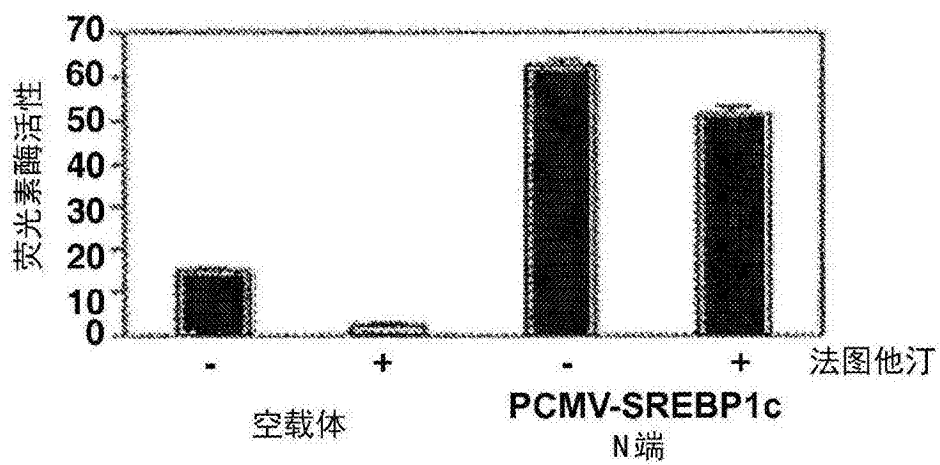


图18B

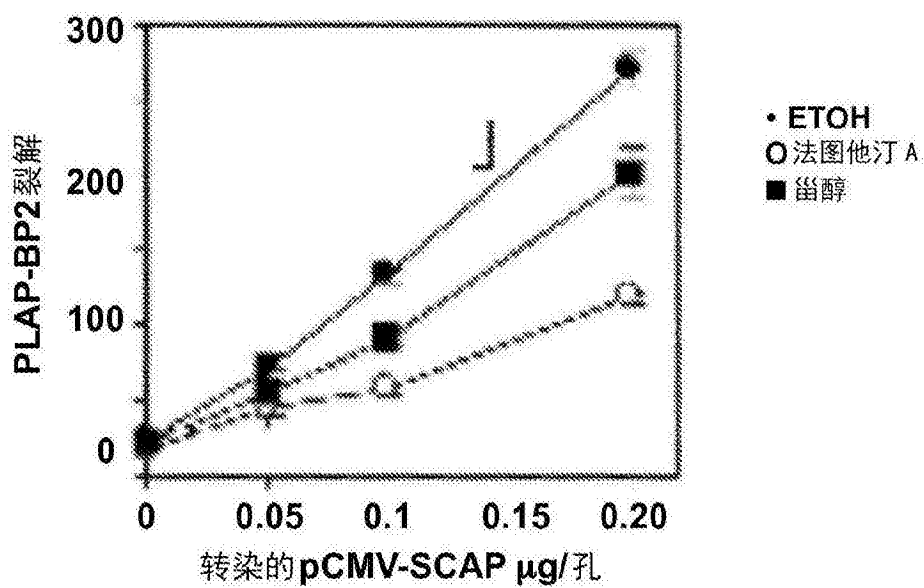


图18C

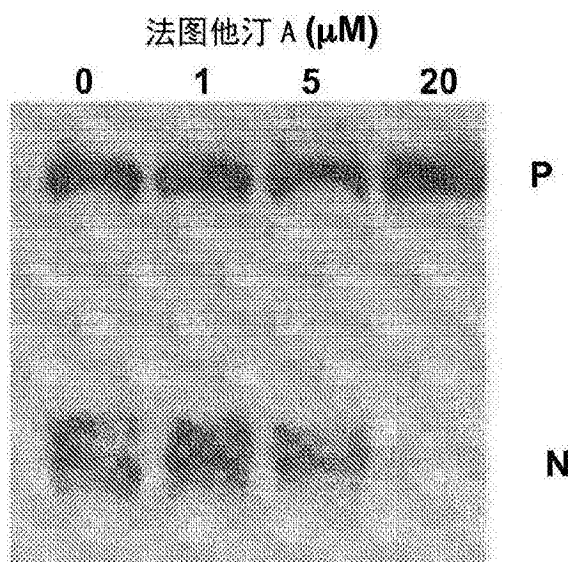


图18D

布雷菲德菌素 A	-			+		
甾醇	-	-	+	-	-	+
法图他汀 A	-	+	-	-	+	-

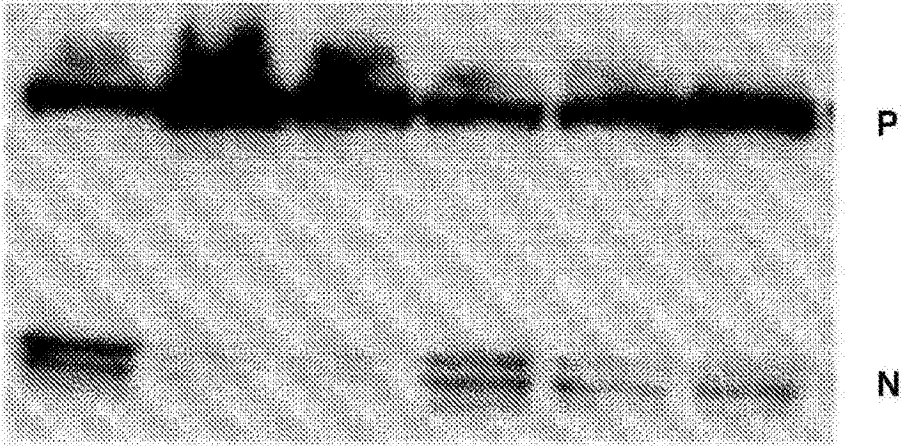


图19A

甾醇	-	-	+
法图他汀 A	-	+	-

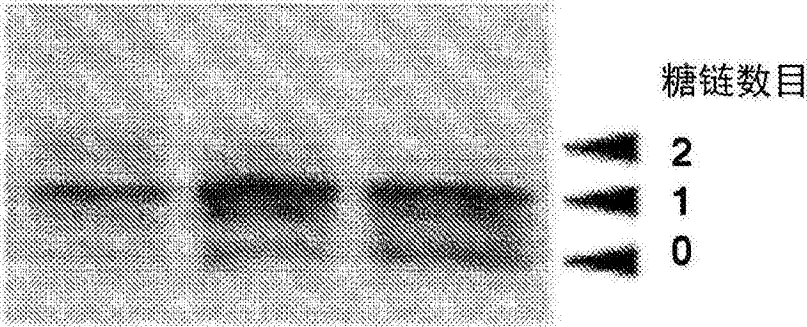


图19B

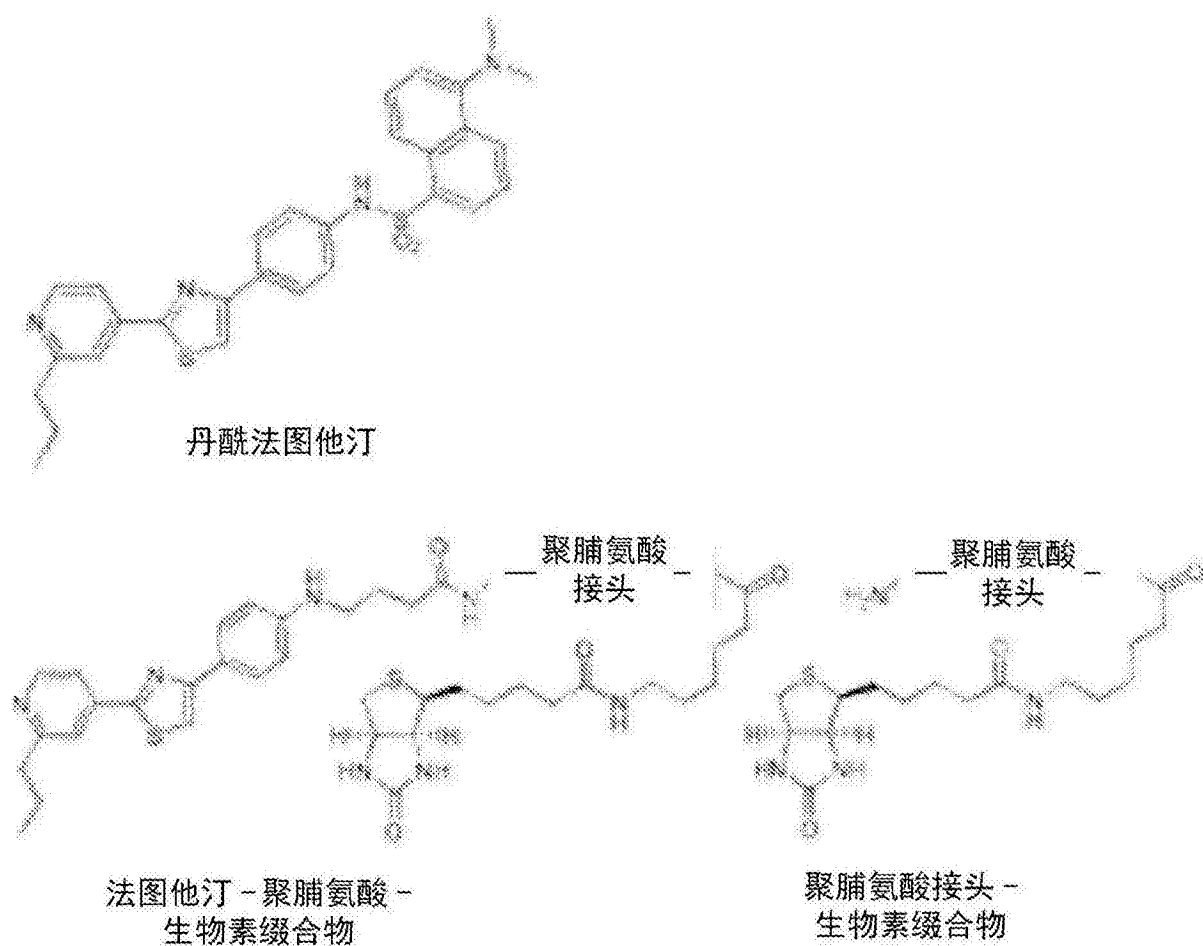


图20A

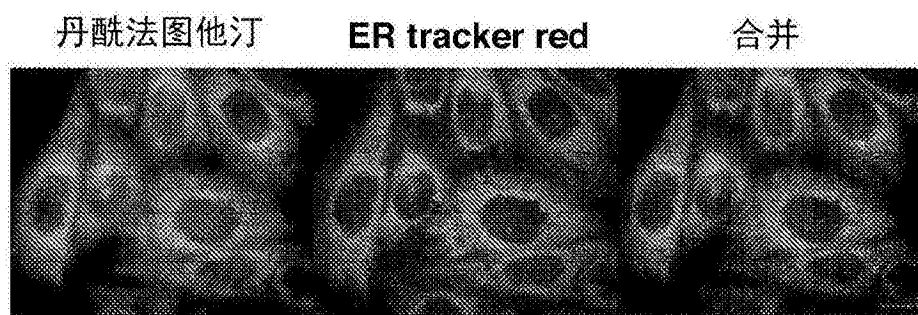


图20B

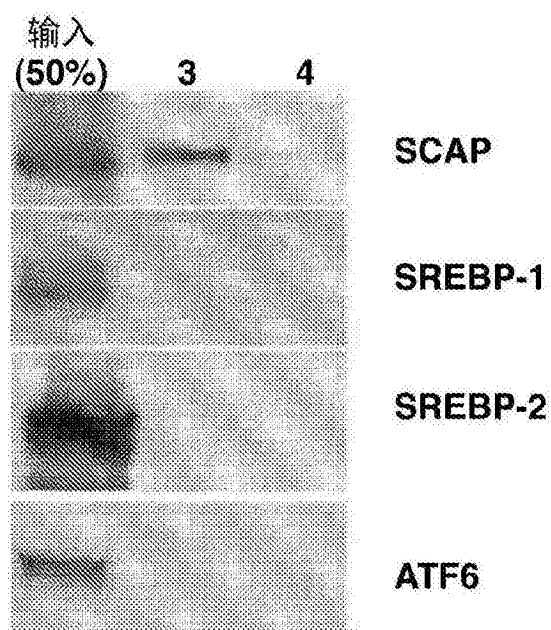


图20C

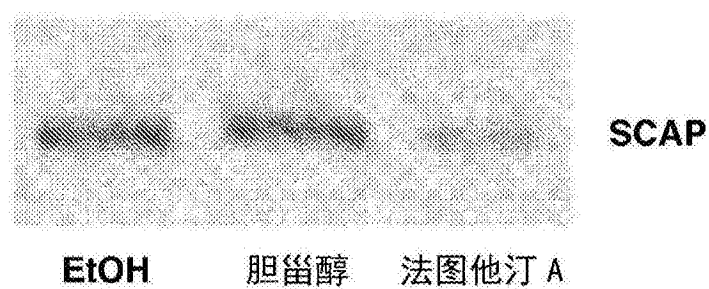


图20D

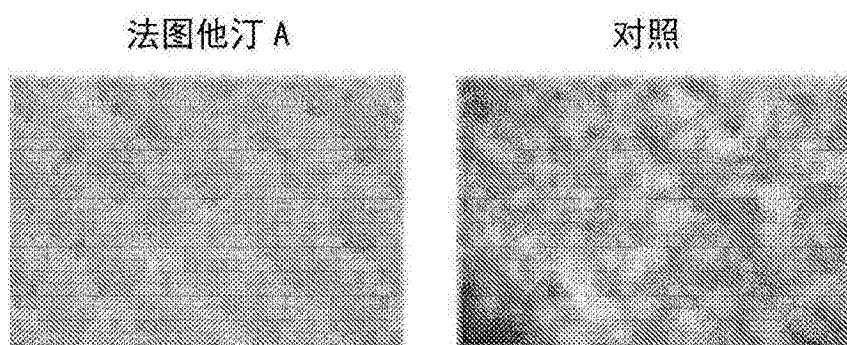


图21

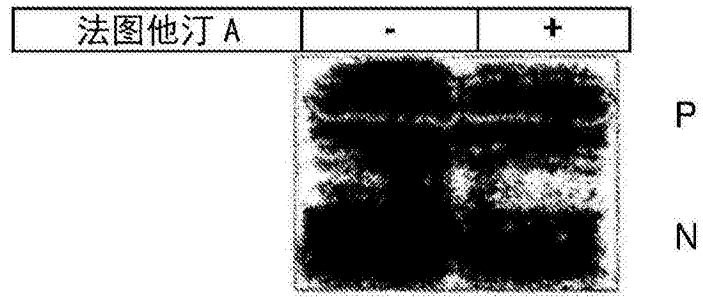


图22

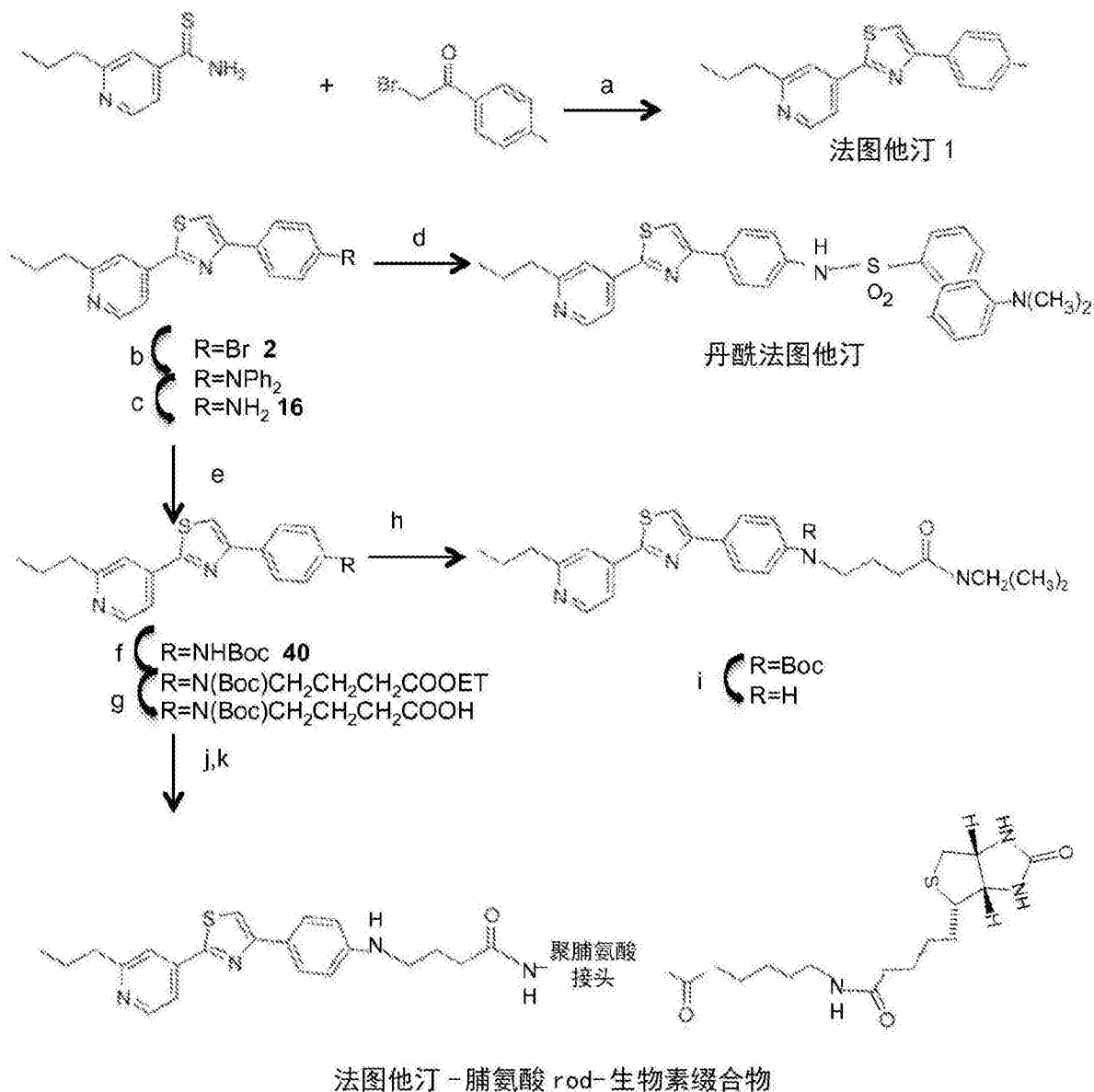


图23

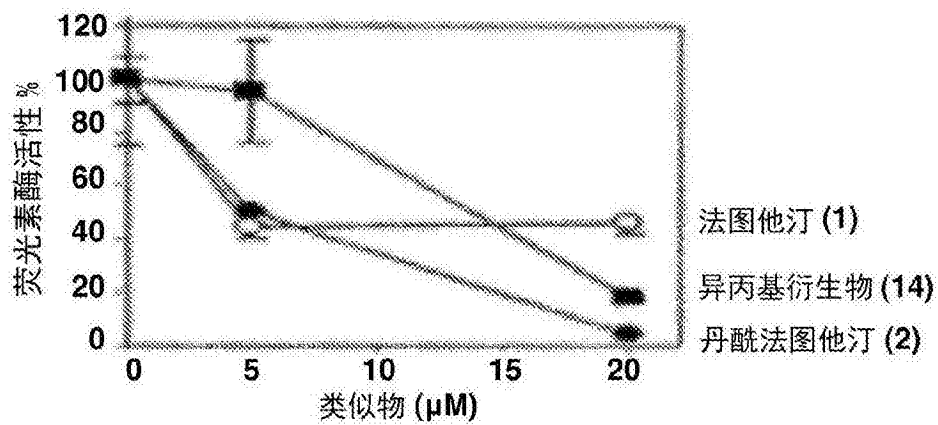


图24

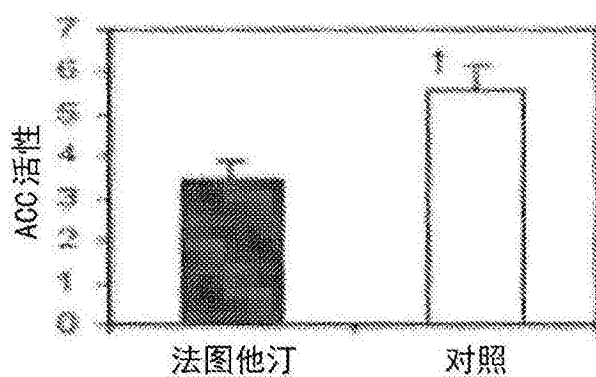


图25A

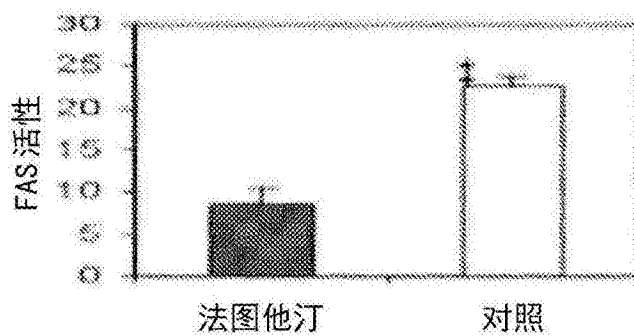


图25B

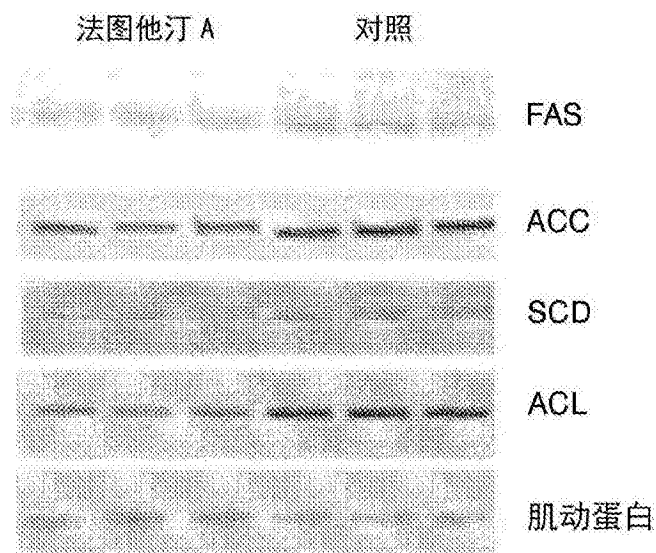


图25C

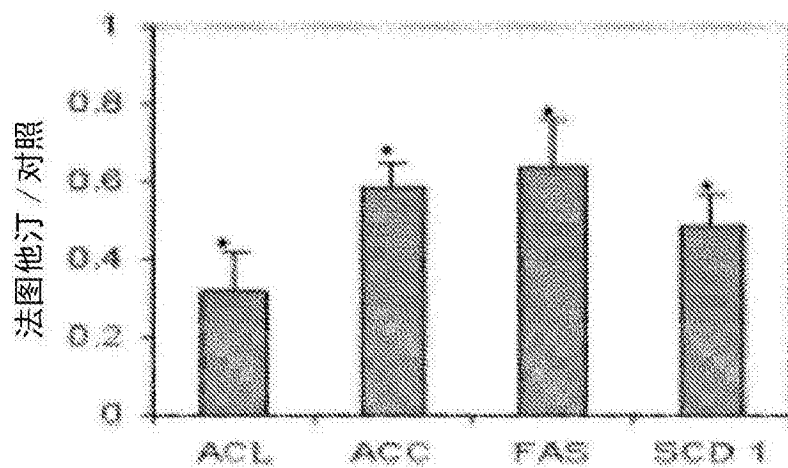


图25D

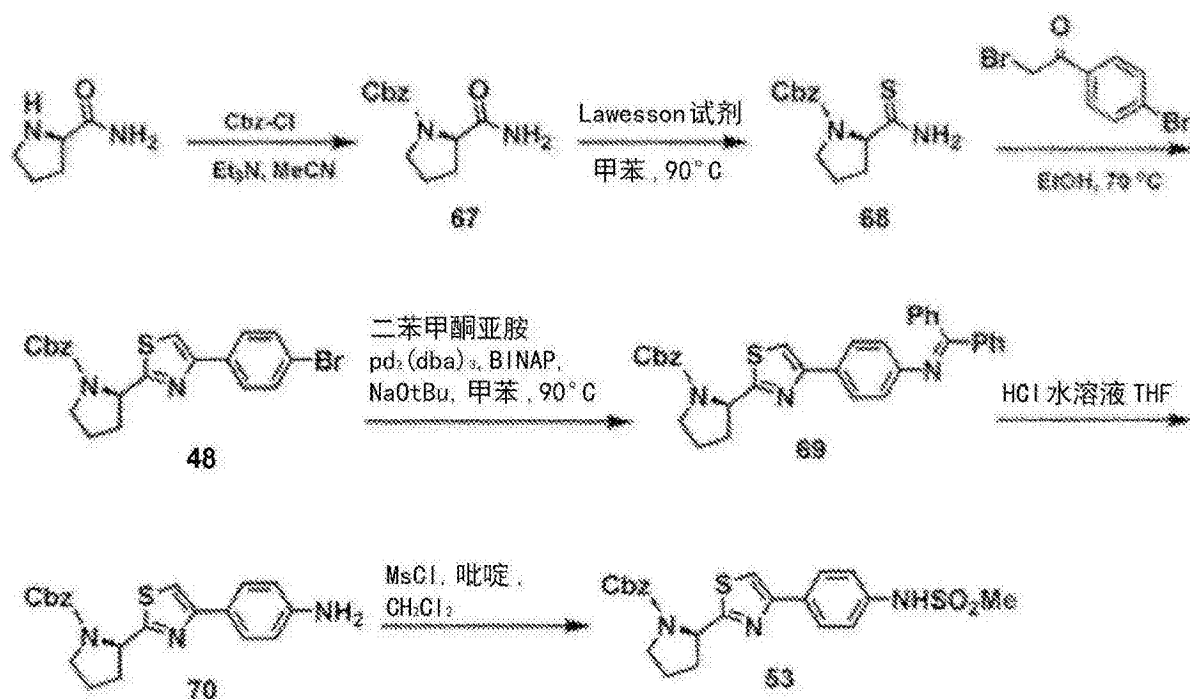
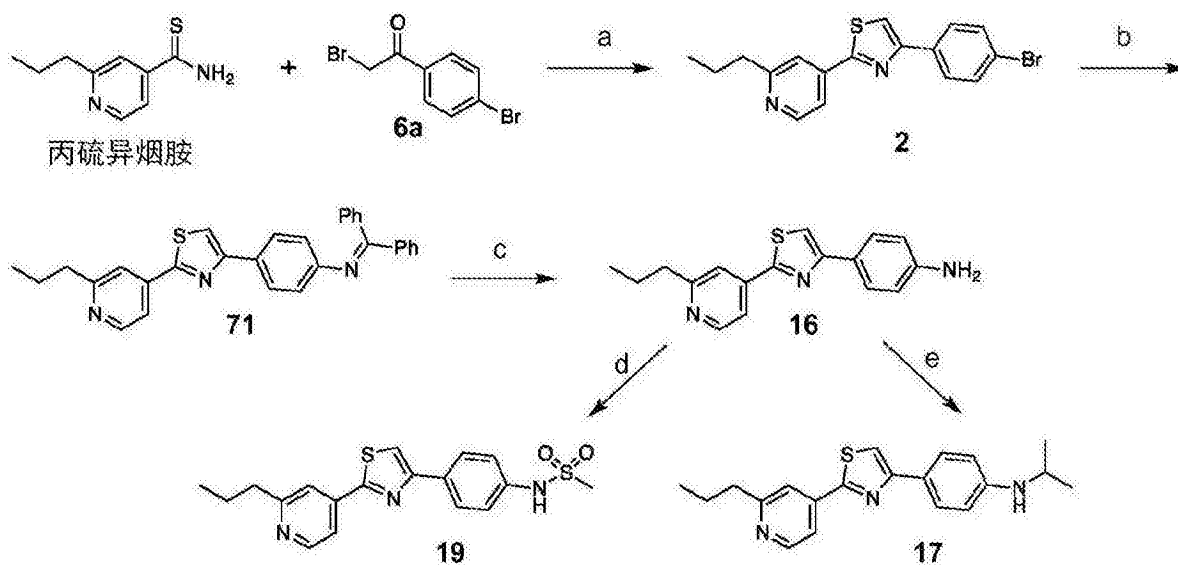


图26



试剂和条件 : a) EtOH , 70°C ; b) 二苯甲酮亚胺, $\text{Pd}(\text{dba})_3$, BINAP, NaOtBu , 甲苯, 回流 ; c) HCl 水溶液, THF ; d) MsCl , 吡啶, CH_2Cl_2 , 0°C ; e) 丙酮, AcOH , $\text{Na(OAc)}_3\text{BH}$, CH_2Cl_2 , 室温

图27

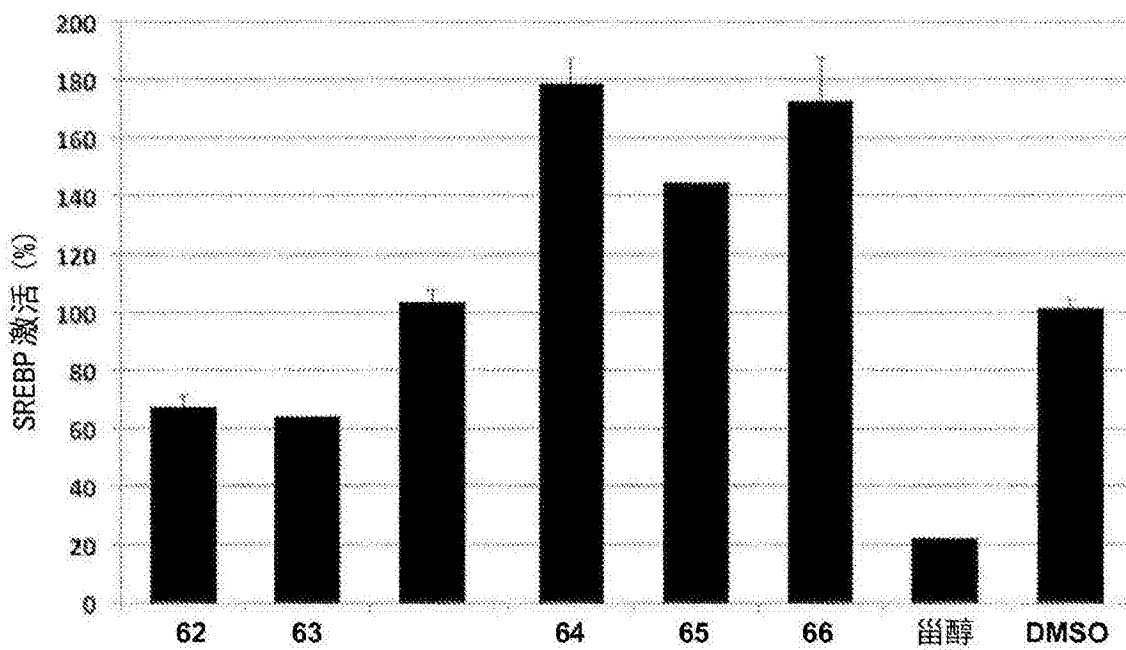


图30

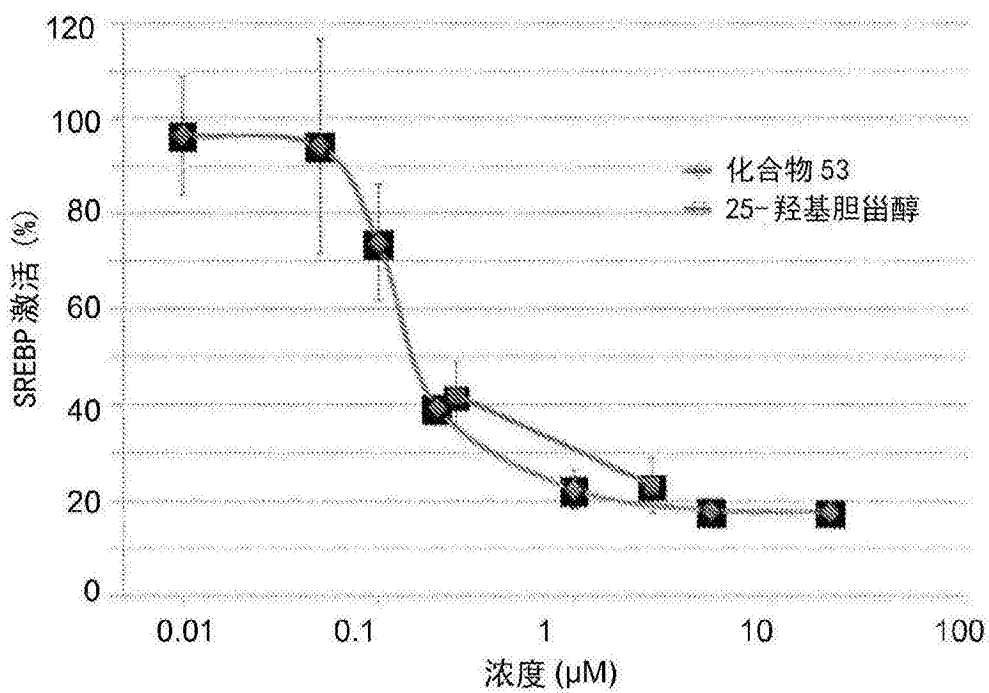


图31

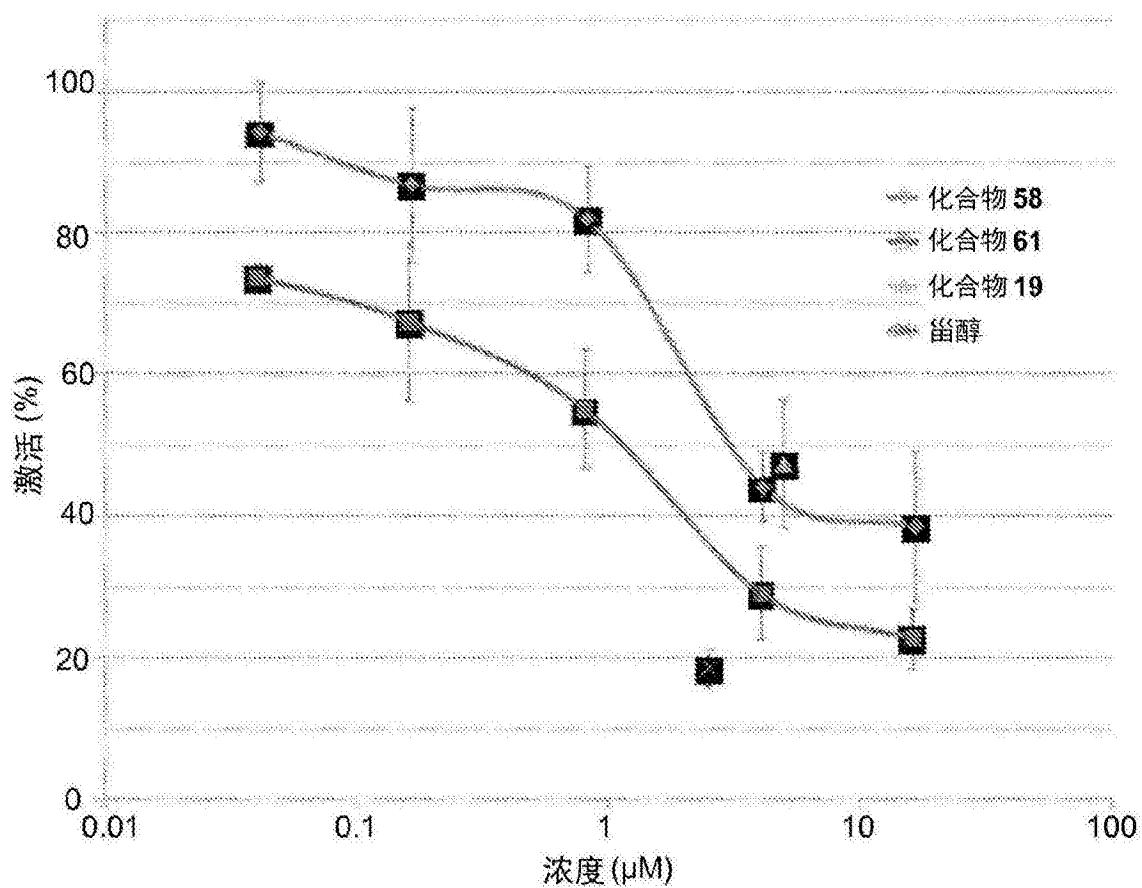


图32

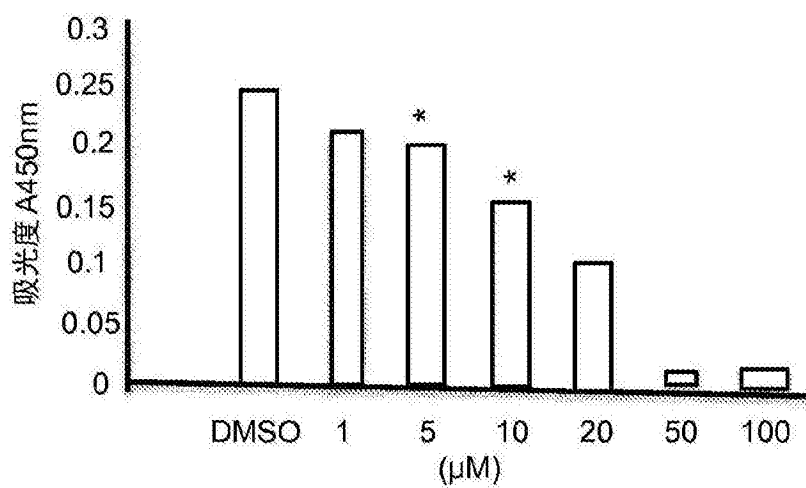


图33A

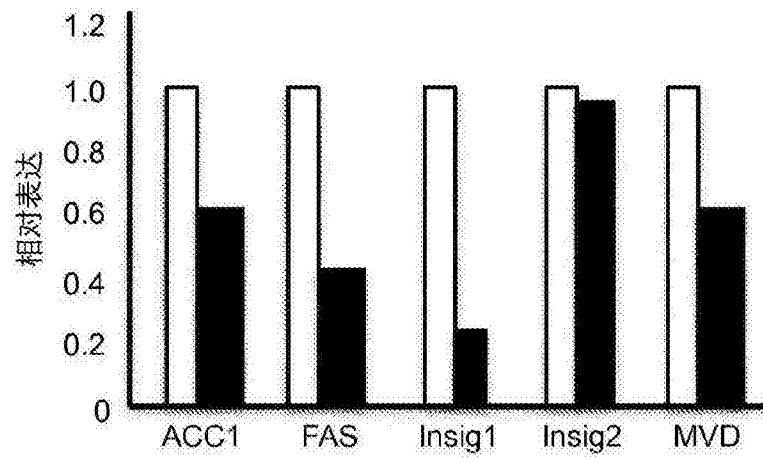


图33B

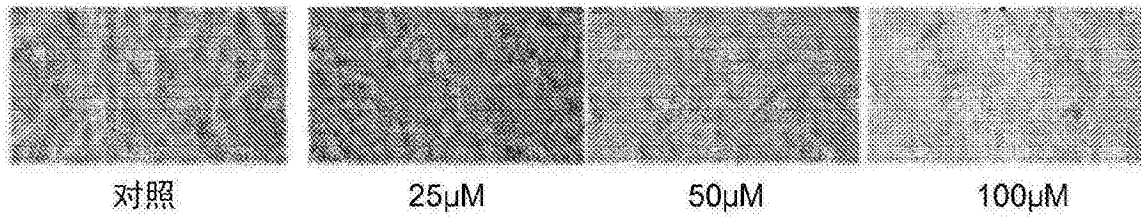


图34A

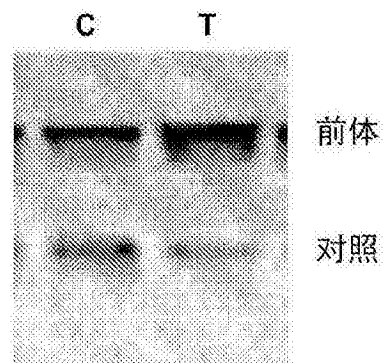


图34B

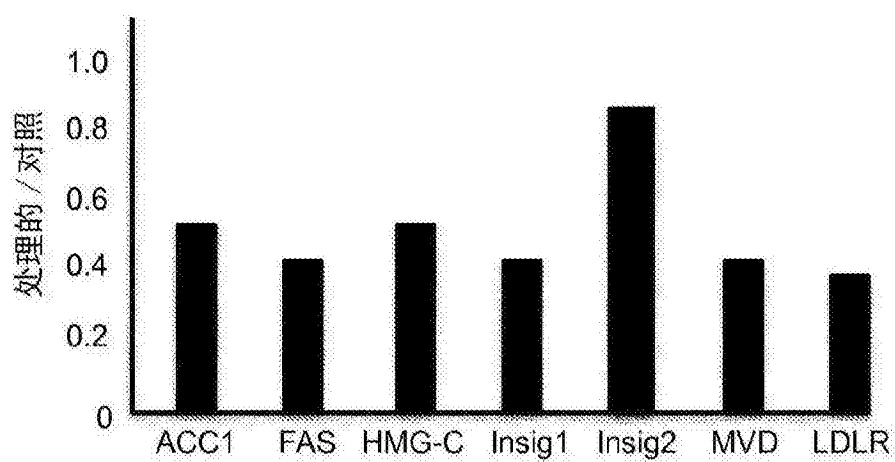


图34C

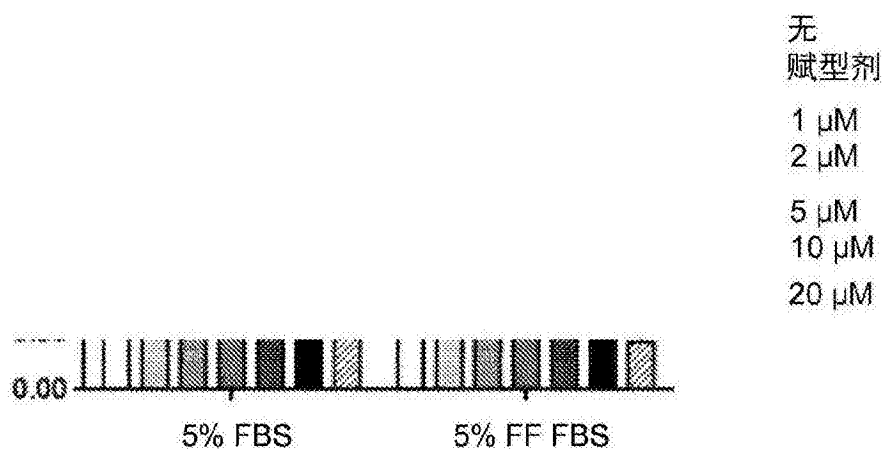


图35A

化合物 19 μ M 在 5% FBS 中

图35B

*
*
*
*

化合物 19 μM 在 5% FF FBS 中

图35C

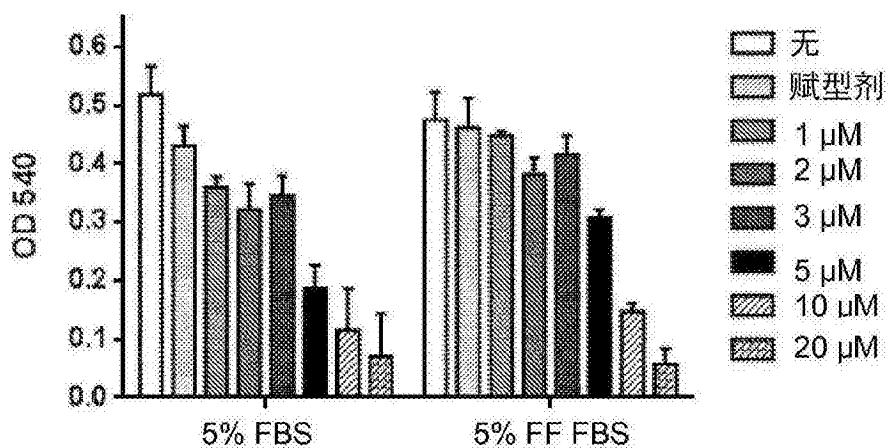


图35D

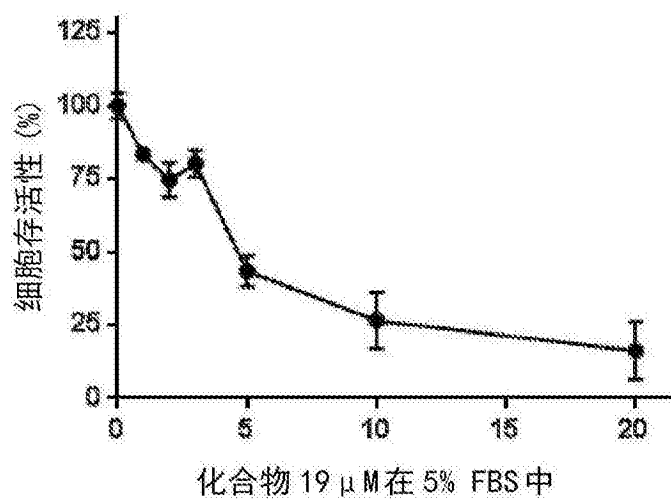


图35E

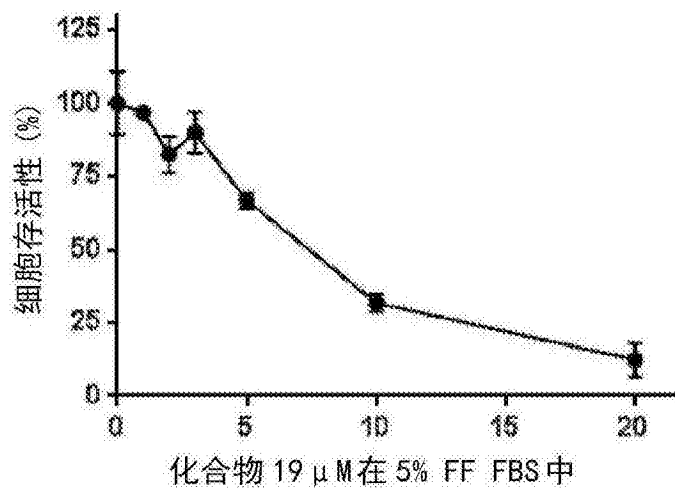


图35F

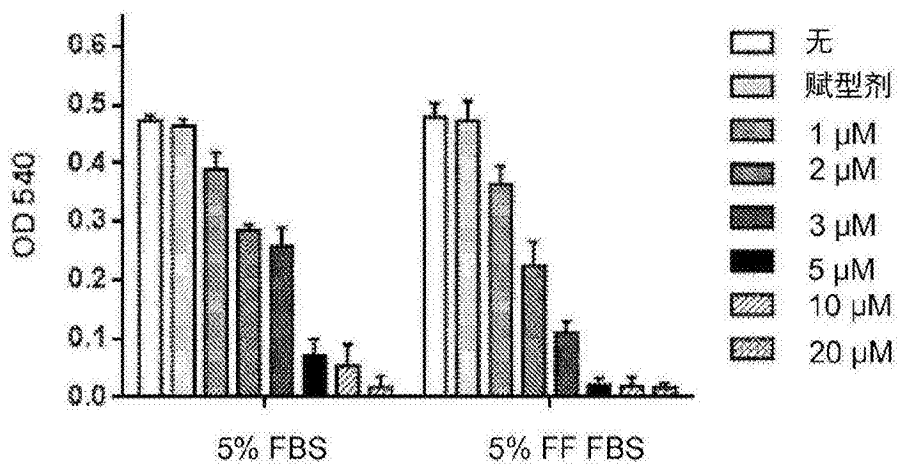


图36A

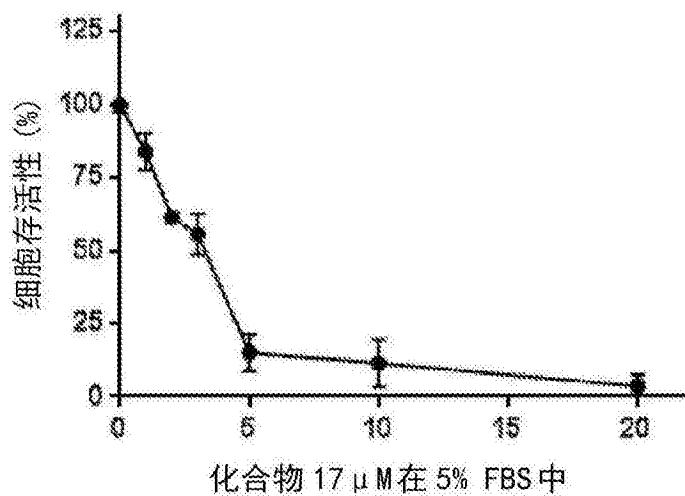


图36B

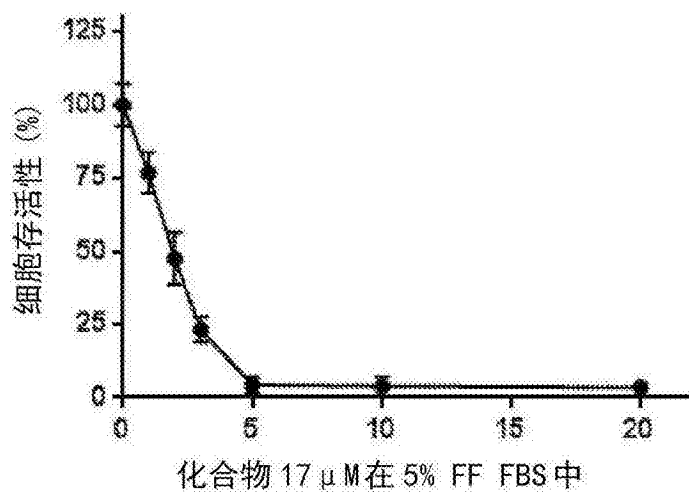


图36C

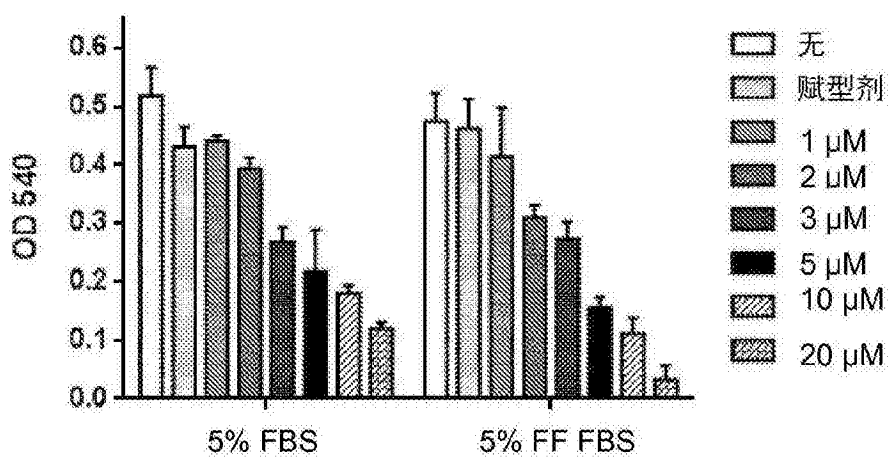


图36D

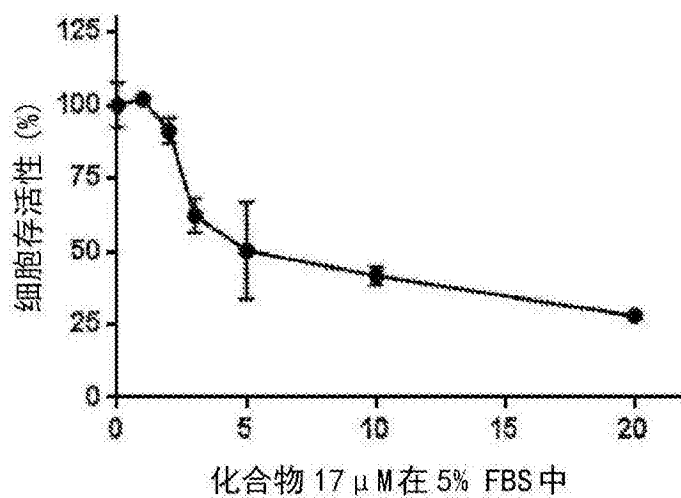


图36E

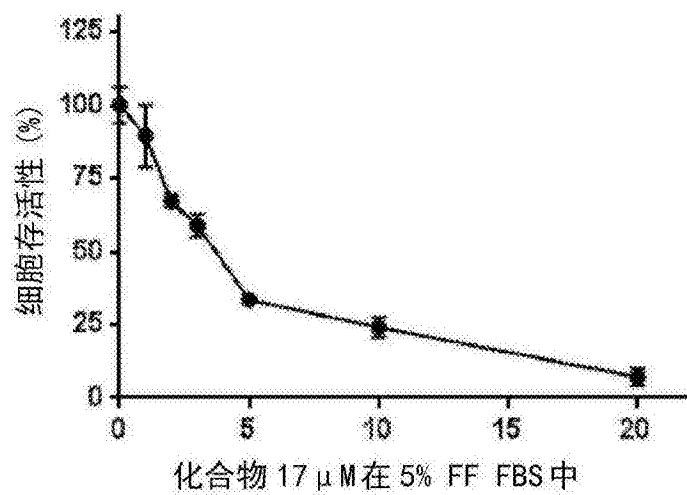


图36F

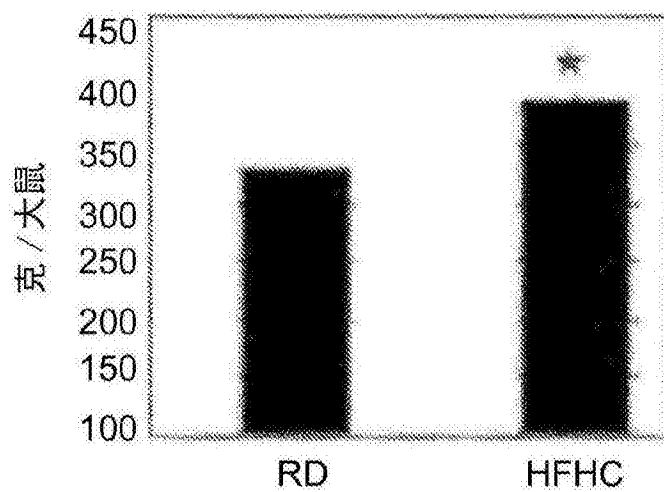


图37A

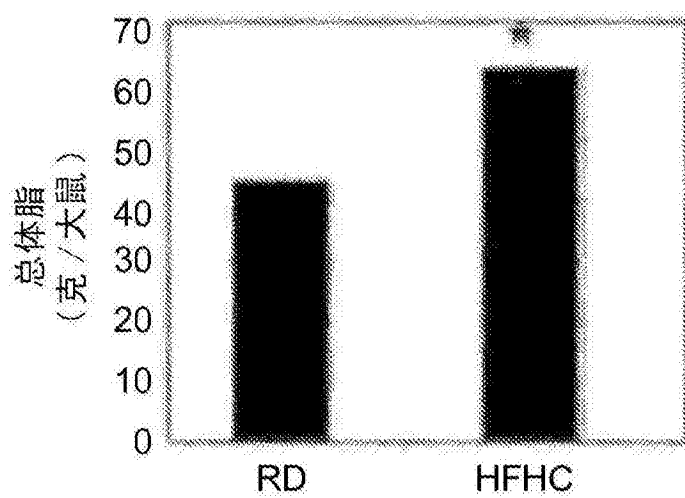


图37B

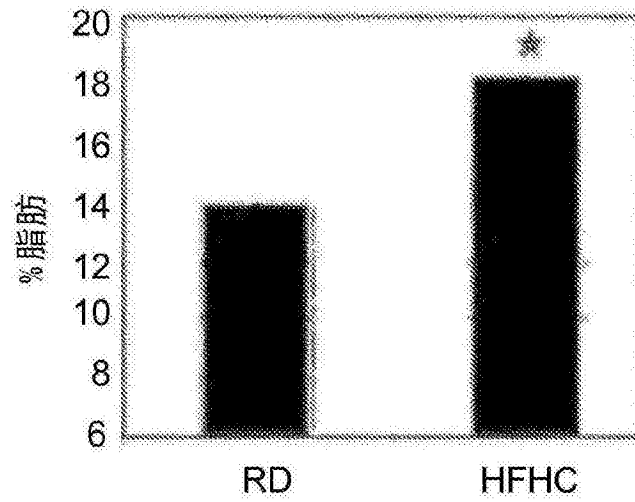


图37C

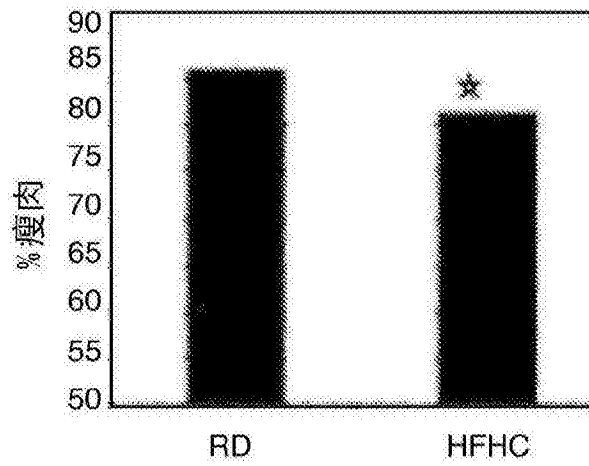


图37D

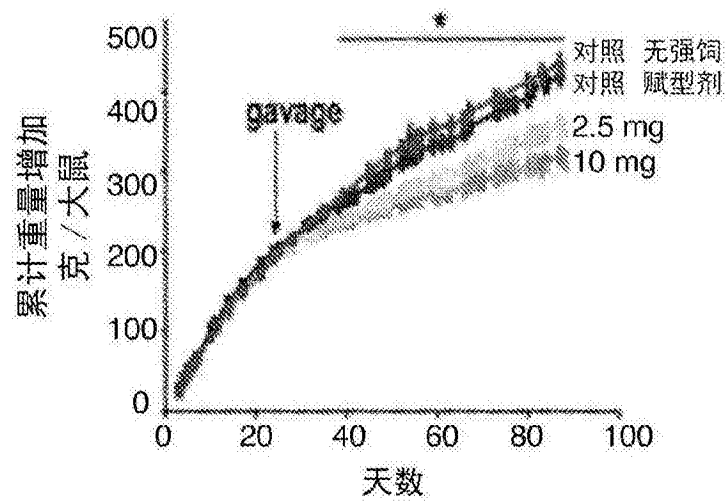


图38A

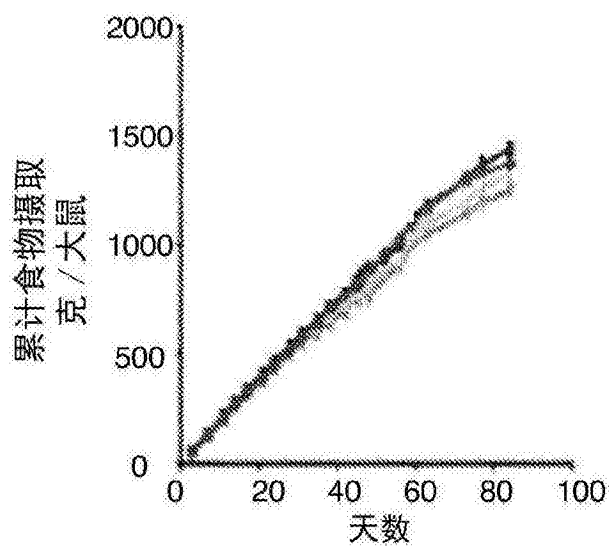


图38B

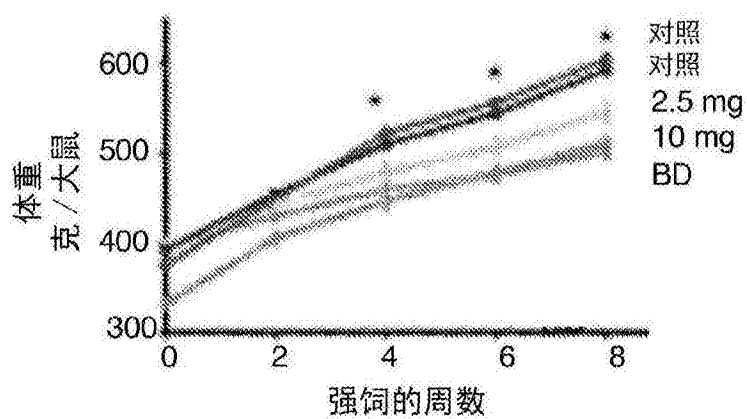


图39A

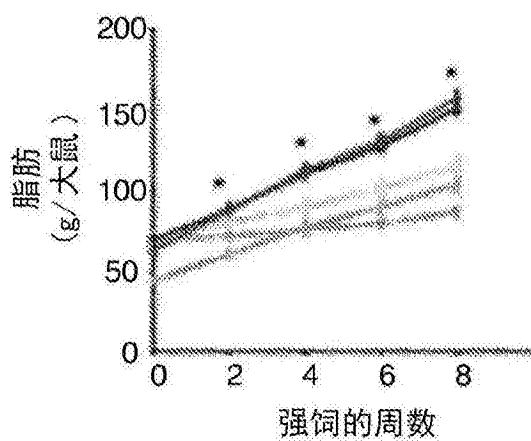


图39B

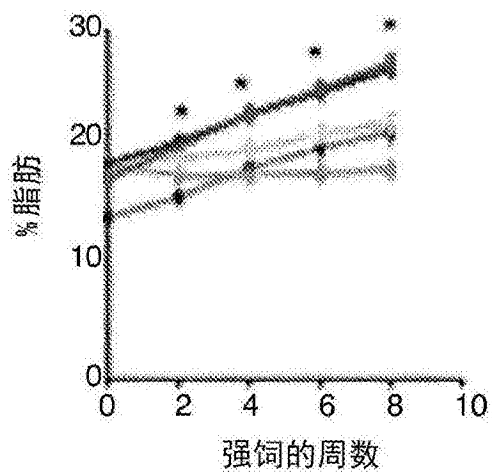


图39C

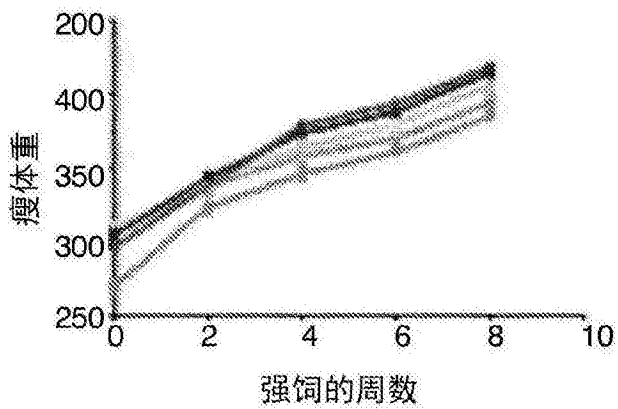


图39D

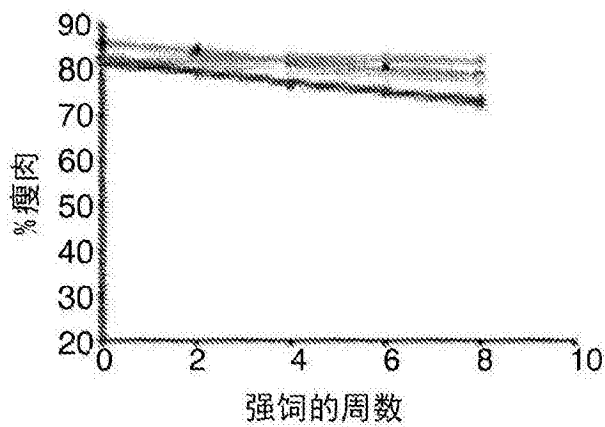
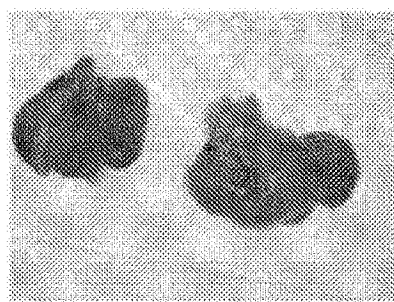


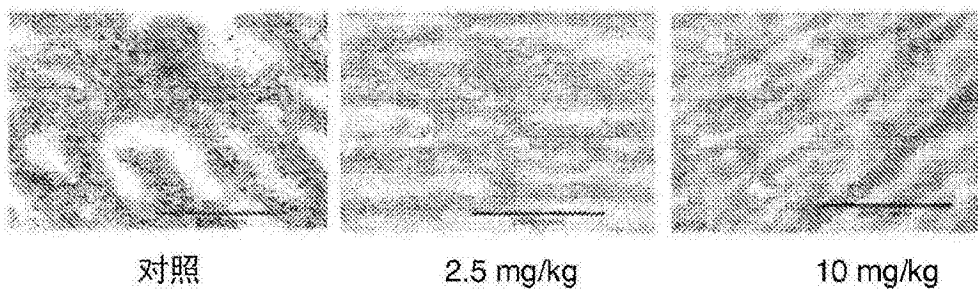
图39E



处理的

对照

图40A



对照

2.5 mg/kg

10 mg/kg

图40B

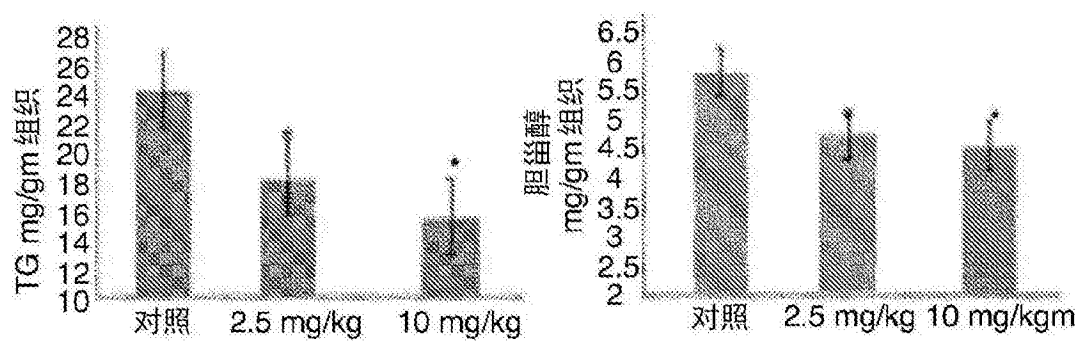


图40C

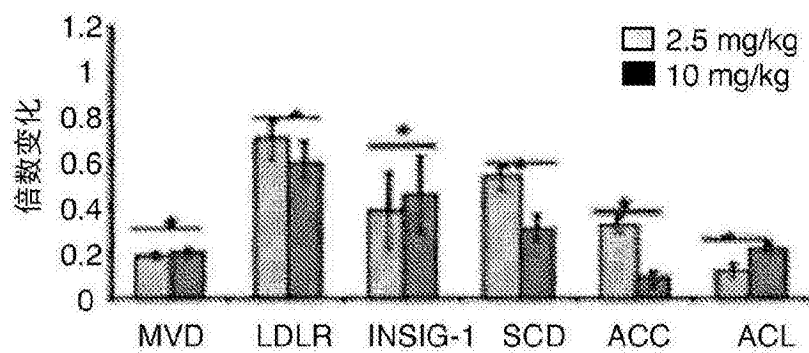


图40D

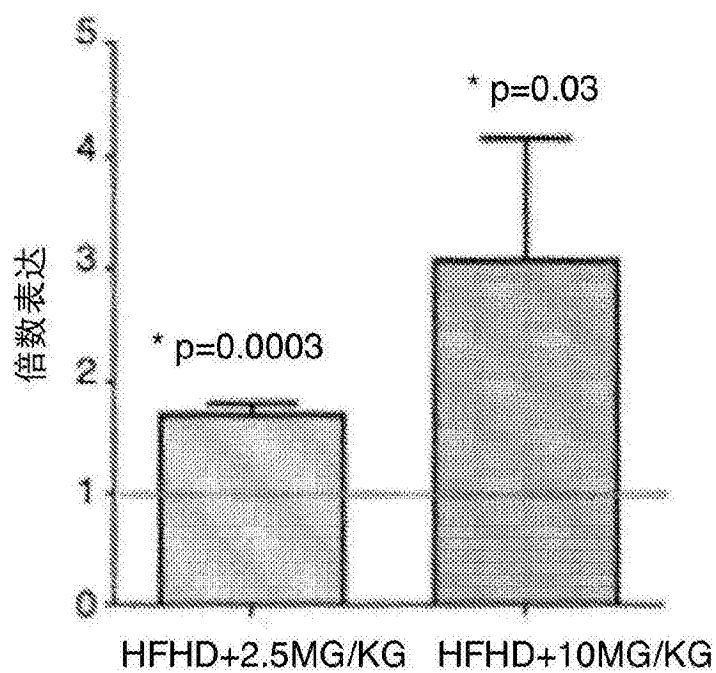


图41