



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119031908 A

(43) 申请公布日 2024.11.26

(21) 申请号 202380023191.0

(22) 申请日 2023.03.03

(30) 优先权数据

22160079.4 2022.03.03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/055490 2023.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/166203 EN 2023.09.07

(71) 申请人 导博药物公司

地址 意大利

(72) 发明人 马尔塞洛·阿莱格雷蒂

安德烈亚·阿拉米尼

詹卢卡·比安基尼

西尔维娅·德阿莱西奥

拉斐尔·西普里亚诺杜特拉

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理师 张珊珊 陈九洲

(51) Int.Cl.

A61K 31/196 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

G07D 333/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图7页

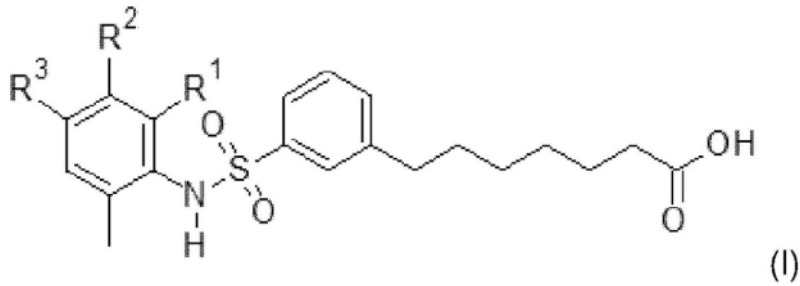
(54) 发明名称

用于治疗炎性肠病的GPR120激动剂

(57) 摘要

本发明涉及GPR120激动剂,其用于治疗炎性肠病,特别是溃疡性结肠炎或克罗恩病。

1. 式 (I) 的 GPR120 激动剂, 其用于在个体中预防或治疗炎性肠病,



其中:

R¹是CH₃,

R²是H,

R³选自F、Cl和CF₃,

或者

R¹和R²独立地选自经取代或未经取代的苯基或噻吩、以及H, 前提是R¹或R²中的至少一者是H, 并且

R³是F,

其中当所述苯基或噻吩被取代时, 取代基优选地选自Cl、F或CH₃, 更优选地在所述苯基上的第2、3或4位或者在所述噻吩上的第3、4或5位。

2. 根据权利要求1所述应用的GPR120激动剂, 其选自:

7-(3-(N-(4-氟-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸、

7-(3-(N-(4-氯-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸、

7-(3-(N-(4-三氟甲基-2,6-二甲基-苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸、

7-(3-(N-(6-氟-4-甲基-[1,1'-联苯基]-3-基)氨磺酰基)苯基)庚酸、

7-(3-{{4-氟-2-甲基-5-(噻吩-2-基)苯基}氨磺酰基}苯基)庚酸、

和

7-(3-(N-(5-氟-3-甲基-[1,1'-联苯基]-2-基)氨磺酰基)苯基)庚酸。

3. 根据权利要求1或2所述应用的GPR120激动剂, 其是7-(3-(N-(4-氯-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸。

4. 根据权利要求1至3所述应用的GPR120激动剂, 其中所述炎性肠病是溃疡性结肠炎或克罗恩病。

5. 根据权利要求1至4所述应用的GPR120激动剂, 其中所述GPR120激动剂经口施用。

6. 根据权利要求1至5所述应用的GPR120激动剂, 其中所述GPR120激动剂以药物组合物的形式施用, 所述药物组合物不是控制释放制剂和/或胃抗性制剂。

7. 药物组合物, 其包含根据权利要求1至3所述的GPR120激动剂, 以及至少一种惰性可药用赋形剂, 所述药物组合物用于在个体中预防或治疗炎性肠病。

8. 根据权利要求7所述应用的药物组合物, 其用于经口施用。

9. GPR120激动剂, 其是7-(3-{{4-氟-2-甲基-5-(噻吩-2-基)苯基}氨磺酰基}苯基)庚酸。

用于治疗炎性肠病的GPR120激动剂

技术领域

[0001] 本发明涉及GPR120激动剂,其用于治疗炎性肠病。

背景技术

[0002] 炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)标志着胃肠道的慢性炎症性病症组,其中最常见的是胃肠道慢性炎症性病症是溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)和克罗恩病(Crohn's disease,CD)。在溃疡性结肠炎中,炎症限于大肠(结肠)和直肠的黏膜层,而在克罗恩病中,炎症最常见地是影响回肠,但可以以斑块状分布影响胃肠道的任何部分,甚至口腔。

[0003] 两种病症共有相似的症状,例如腹泻、腹痛、直肠出血和体重减轻。然而,尽管它们之间有相似性,但存在一些不同的其他症状。例如,营养不良在克罗恩病中非常常见,因为小肠负责营养物的吸收并且小肠是受影响的一者,相比之下,溃疡性结肠炎与便血(blood in stool)和直肠出血相关,而便血和直肠出血在克罗恩病中不太常见。超过50%的患有CD的人患有叶酸和维生素D缺乏,而超过50%的患有UC的人患有铁缺乏。

[0004] 炎性肠病等同地影响男性和女性,其通常起始于青少年期并且约25%的患有IBD的患者小于20岁。在一些情况下,其也可发生在成年期(Journal of Medicine and Life第12卷,第2期,2019年四月至六月,第113至122页)。虽然炎性肠病的病因在很大程度上仍然是未知的,但其是由遗传和环境要素、失调的免疫应答以及微生物组改变之间极其复杂的相互作用引起的,但这些因素都不足以单独引起该疾病。为了诊断这种病症,使用了临床、内窥镜、组织学和放射学测试(Zhang Y.et al.World J Gastroenterol2014;20(1):91-99)。

[0005] 目前,炎性肠病的治疗基于逐级方法(stage-by-stage approach)。

[0006] 对于轻度至中度克罗恩病来说,治疗的第一步是使用氨基水杨酸盐,如5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid,5-ASA),在商业上也称为美沙拉嗪(Mesalamine)。如果其未显示出效力,则使用抗生素、皮质类固醇和免疫抑制药物来作为住院之前的最后尝试。

[0007] 对于溃疡性结肠炎来说,常规治疗包括5-氨基水杨酸、皮质类固醇和嘌呤类似物(硫唑嘌呤和巯基嘌呤)。如果这些不起作用,则用免疫抑制药物例如钙调磷酸酶抑制剂、他克莫司(tacrolimus)和TNF- α 抑制剂治疗患者(Baumgart DC et al.The Lancet 2007;369(9573):1641-57)。

[0008] 然而,现有的治疗性策略并不总是导致缓解,并且可能与许多副作用有关。因此,对于相当多的患者来说,这种使人衰弱的病症仍远未以令人满意的方式得到控制。因此,IBD仍与许多患者的未满足的医疗需求相关(Gordon et al,Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.2015(27),804-812)。

[0009] 因此,强烈感到需要开发用于治疗炎性肠病的具有较高效力和较少副作用的新的治疗性方法。

[0010] 数项研究已经表明了 ω -3多不饱和脂肪酸作为辅助性治疗来施用在预防或治疗

溃疡性结肠炎和克罗恩病方面的有益作用。其还证明了 ω -3脂肪酸是产生可调节和减弱炎症过程并导致IBD缓解的保护素(protectin)、消退素(resolvin)和maresin的底物,并因此可被认为是治疗这些炎症病症的新的补充方法(Marton et al, International Journal of Molecular Science 2019, 20(19), 4851)。

[0011] GPR120是G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPR)的视紫红质家族中的成员,并且已表明介导 ω -3脂肪酸的一些抗炎和胰岛素增敏作用(Young Oh, Cell. 2010 September 3; 142(5): 687-698)。

[0012] 已表明GPR120在人的肠中,在内分泌L细胞、K细胞或I细胞中大量表达,在那里GPR120充当游离脂肪酸的外感受器。这些细胞存在于肠绒毛中并且面向与食物接触的肠腔(Furness, J.B. et al. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013, 10, 729-740)。

[0013] 另一些研究已确定,在末端回肠和近端结肠中,不仅内分泌细胞表达GPR120而且绒毛内衬的所有上皮细胞都表达GPR120(Paulsen et al, PLoS ONE 2014, 9(2): e88227, doi:10.1371/journal.pone.0088227)。

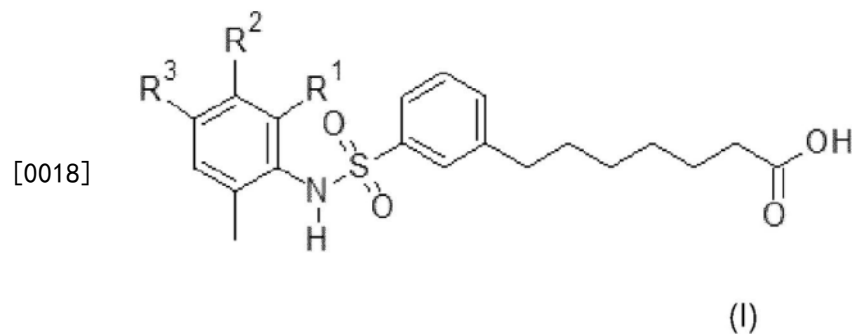
发明内容

[0014] 如将在实验部分中所示的,本发明人已经出乎意料地鉴定出许多在预防或治疗炎症肠病方面特别有效的结构性相关的GPR120激动剂。

[0015] 这些化合物在经口施用之后吸收较差,并在回肠和结肠中以高浓度浓缩,并因此能够有效地局部作用以预防或治疗炎症肠病。

[0016] 此外,本发明人发现与其他已知的GPR120激动剂不同,这些化合物在受体的结合和活化之后不会引起GPR120的内化和降解,并因此能够引发和维持强效的激动活性。

[0017] 因此,本发明的第一目的是式(I)的GPR120激动剂,其用于在个体中预防或治疗炎症肠病,



[0019] 其中:

[0020] R^1 是 CH_3 ,

[0021] R^2 是H,

[0022] R^3 选自F、Cl和 CF_3 ,

[0023] 或者

[0024] R^1 和 R^2 独立地选自经取代或未经取代的苯基或噻吩、以及H,前提是 R^1 或 R^2 中的至少一者是H,并且

[0025] R^3 是F,

[0026] 其中当所述苯基或噻吩被取代时,取代基优选地选自Cl、F或 CH_3 ,更优选地在苯基

上的第2、3或4位或者在噻吩上的第3、4或5位。

[0027] 本发明的第二目的是包含如上所述的式(I)的GPR120激动剂的药物组合物,其用于在个体中预防或治疗炎性肠病。

[0028] 本发明的第三目的是用于预防或治疗炎性肠病的方法,其包括向有此需要的个体施用治疗有效量的如上所述的式(I)的GPR120激动剂。

附图说明

[0029] 图1示出了在实施例1a)中所述的实验组中随时间的体重减轻%(图1A)和DAI评分(图1B)。DSS I、DSS II和DSS III表示疾病发生(急性/慢性)的阶段。该实验在实施例1b)中描述。

[0030] 图2示出了在实施例1a)中所述的实验组中,在第39天进行小鼠处死之后测量的结肠长度,如实施例1c)中所述。

[0031] 图3示出了在实施例1d)中所述的针对实施例1a)中所述的每个实验组的内窥镜测定的照片。

[0032] 图4示出了在实施例1d)中所述的针对实施例1a)中所述的每个实验组的综合内窥镜评分。

[0033] 图5示出了如实施例1d)中所述的针对实施例1a)中所述的每个实验组的结肠增厚评分(图5A)和血管分型(vascular pattern)评分(图5B)。

[0034] 图6示出了如实施例1d)中所述的针对实施例1a)中所述的每个实验组的可见纤维蛋白评分(图6A)和黏膜表面颗粒度评分(图6B)。

[0035] 图7示出了如实施例1e)中所述的针对实施例1a)中所述的每个实验组的组织学分析。其示出了用苏木精和伊红染色的组织学切片。

[0036] 图8是针对实施例1a)中所述的每个实验组的针对在实施例1e)的表中示出的Rachmilewitz评分中的每个参数的平均组织学评分。

[0037] 图9示出了GPR120信号传导的示意图。

[0038] 图10示出了针对实施例1a)中所述的每个实验组的GPR120和 β -抑制蛋白2(β -arrestin 2)的western印迹结果(图10B)以及使用Image J对western印迹的印迹进行的密度分析,以及针对每个实验组的经共免疫沉淀的 β -抑制蛋白2与GPR120的水平之间的所得比率(图10A),如实施例1f)中所述。

[0039] 图11示出了GPR40和 β -抑制蛋白2的western印迹结果(图11B)以及使用Image J对western印迹的印迹进行的密度分析,以及针对每个实验组的经共免疫沉淀的 β -抑制蛋白2与GPR40的水平之间的所得比率(图11A),如实施例1f)中所述。

[0040] 定义

[0041] 根据本发明,术语“预防”是指在病症或病理事件确立或发生之前,向个体进行施用以获得对该疾病或病理事件的部分或完全预防。

[0042] 根据本发明的一个实施方案,预防是完全预防,其中病症或病理事件被完全阻断。

[0043] 根据本发明的一个替代实施方案,预防是部分预防,其中病症或病理事件的发作或发生被延迟或者严重程度降低。

[0044] 根据本发明,术语“治疗”是指在病症或病理事件建立或发生之后,完全逆转或减

轻该病症或病理事件的严重程度或进展。

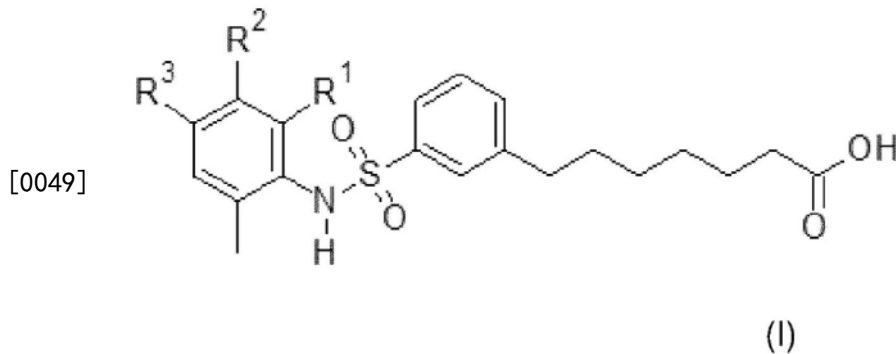
[0045] 根据本发明,术语“个体”是指人或动物,优选是指人。

[0046] 根据本发明,术语“GP120”表示G蛋白偶联受体120(G protein-coupled receptor 120,GPR120),也称为游离脂肪酸受体4。根据本发明,术语“GPR120激动剂”是指与GPR120结合并激活GPR120信号传导途径的化合物。

[0047] 根据本发明,术语“个体”是指人或动物,优选是指人。

具体实施方式

[0048] 本发明的第一目的是式(I)的GPR120激动剂,其用于在个体中预防或治疗炎性肠病,



[0050] 其中:

[0051] R¹是CH₃,

[0052] R²是H,

[0053] R³选自F、Cl和CF₃,

[0054] 或者

[0055] R¹和R²独立地选自经取代或未经取代的苯基或噻吩、以及H,前提是R¹或R²中的至少一者是H,并且

[0056] R³是F,

[0057] 其中当所述苯基或噻吩被取代时,取代基优选地选自Cl、F或CH₃,更优选地在苯基上的第2、3或4位或者在噻吩上的第3、4或5位。

[0058] 优选地,所述式(I)的GPR120激动剂选自:

[0059] 7-(3-(N-(4-氟-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸、

[0060] 7-(3-(N-(4-氯-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸、

[0061] 7-(3-(N-(4-三氟甲基-2,6-二甲基-苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸、

[0062] 7-(3-(N-(6-氟-4-甲基-[1,1'-联苯基]-3-基)氨磺酰基)苯基)庚酸

[0063] 7-(3-{{4-氟-2-甲基-5-(噻吩-2-基)苯基}氨磺酰基}苯基)庚酸、

[0064] 和

[0065] 7-(3-(N-(5-氟-3-甲基-[1,1'-联苯基]-2-基)氨磺酰基)苯基)庚酸。

[0066] 根据本发明应用的特别优选的式(I)的GPR120激动剂是7-(3-(N-(4-氟-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸,也称为DFL23806。

[0067] 本发明的另一个目的是式(I)的新的GPR120激动剂7-(3-{{4-氟-2-甲基-5-(噻

吩-2-基)苯基]氨磺酰基)苯基)庚酸。

[0068] 如将在实验部分中所示的,本发明人发现了上述式(I)的GPR120激动剂在预防和治疗炎性肠病方面高度有效。

[0069] 优选地,所述炎性肠病是克罗恩病或溃疡性结肠炎。

[0070] 根据本发明应用的GPR120激动剂向个体的施用是按照已知方法进行的。

[0071] 优选地,所述施用是经口施用或经直肠施用。

[0072] 本发明人发现GPR120激动剂对炎性肠病的治疗作用高度依赖于该分子在胃肠道中的炎症部位处的表面活性。因此,当经口施用GPR120激动剂时,将足够量的活性药物递送至受影响的区域对于治疗性效力来说至关重要。同时,该化合物的全身可用性对于治疗作用来说是不可用的,并且应该降低至最小,以提高治疗效力并避免任何全身副作用。

[0073] 本发明人还发现,根据本发明的式(I)的GPR120激动剂具有药代动力学和稳定性特征,这使得它们特别适于通过经口施用来施用。特别地,如实施例2中所表明的,本发明人已确定了当经口施用式(I)的GPR120激动剂时,其表现出特征在于非常低的全身吸收和在较下胃肠道中达到高浓度的药代动力学谱,并因此适于在受IBD影响的胃肠道区域水平上发挥表面作用。

[0074] 此外,还发现这些GPR120激动剂在胃液和肠液中以及对肠微粒体具有高稳定性,并且最后,对Caco-2(人结直肠腺癌细胞的永生化细胞系)具有低渗透性。由于这些特征,式(I)的GPR120激动剂在回肠和大肠的黏膜层水平上实现了表面作用,而不需要用控制释放制剂(controlled release formulation)或胃抗性制剂进行局部递送。

[0075] 因此,优选地,根据本发明应用的式(I)的GPR120激动剂经口施用。

[0076] 优选地,根据本发明应用的式(I)的GPR120激动剂以药物组合物的形式施用。

[0077] 优选地,根据本发明应用的式(I)的GPR120激动剂以不是控制释放制剂的药物制剂的形式施用。

[0078] 优选地,根据本发明应用的式(I)的GPR120激动剂以不是胃抗性制剂的药物组合物的形式施用。

[0079] 本发明的另一个目的是包含如上限定的式(I)的GPR120激动剂、以及至少一种可药用赋形剂的药物组合物,其用于在个体中预防或治疗炎性肠病,如上所述。

[0080] 优选地,本发明的药物组合物被制备成包含以下的合适剂型:有效量的如上所述的式(I)的GPR120激动剂,以及至少一种可药用赋形剂。

[0081] 优选地,本发明的药物组合物适于经口施用或经直肠施用。

[0082] 优选地,用于经直肠施用的所述药物组合物为栓剂、edema、凝胶剂或泡沫剂剂型的形式。

[0083] 优选地,用于经口施用的所述药物组合物为颗粒剂、纤维剂、微粒剂、片剂或胶囊剂的形式。

[0084] 优选地,用于经口施用的所述药物组合物不是控制释放制剂和/或胃抗性制剂。

[0085] 在本申请中,措辞“有效量”意指足以显著实现期望的临床响应的化合物或组合物的剂量。

[0086] 根据本发明应用的式(I)的GPR120激动剂针对任何特定个体的剂量和治疗方案将根据技术人员的知识和专业内的许多因素而变化,这些因素包括例如所使用的特定GPR120

激动剂的半衰期、所使用的制剂和施用途径,个体的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食。

[0087] 如本文中所述,本发明的药物组合物包含式(I)的GPR120激动剂以及至少一种可药用赋形剂,如本文中使用的,所述可药用赋形剂选自如适于所期望的特定剂型的溶剂、稀释剂或其他载剂、分散剂或混悬助剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体黏合剂、润滑剂等。

[0088] 可存在于根据本发明的组合物中的可药用赋形剂的一些实例包括但不限于糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末状黄耆胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油类,例如花生油、棉籽油;红花油;芝麻油;橄榄油;玉米油和大豆油;二醇类,例如丙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等张盐水;无菌水;林格液(Ringer's solution);缓冲盐水;右旋糖溶液;麦芽糖糊精溶液;乙醇;和磷酸盐缓冲溶液。

[0089] 本发明的药物组合物的剂型可通过药物化学家熟悉的技术来制备,并且包括混合、制粒、压缩、溶解、灭菌等。

[0090] 此外,本发明的组合物可使用本领域已知的适当方法或通过Remington's Pharmaceutical Science(最新版),Mack Publishing Company,Easton Pa中所公开的方法适当地配制。

[0091] 剂型还可含有另一些传统成分,例如:防腐剂、稳定剂、表面活性剂、缓冲剂、渗透调节剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、矫味剂等。

[0092] 本发明的另一个方面是用于在个体中预防或治疗炎性肠病的方法,其包括向个体施用有效量的如上所述的式(I)的GPR120激动剂。

[0093] 实验部分

[0094] 统计学分析

[0095] 在所有实验中,使用GraphPad Prism 7(GraphPad软件)进行统计学分析。将数据表示为平均值±SD或±SEM,并且当 $P < 0.05$ 时,认为差异在统计学上显著。对所有实验进行ANOVA多变量分析连同事后修正检验。

[0096] 实施例1——7-(3-(N-(4-氟-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸(DFL23806)在右旋糖酐硫酸钠诱导的结肠炎的小鼠模型中的治疗作用

[0097] a) 模型建立和处理方案

[0098] 将通过施用右旋糖酐硫酸钠(Dextran Sodium Sulfate, DSS)诱导的结肠炎的小鼠模型(Wirtz S. et al. Nature Protocols; 第2卷, 第3期第541至546页; 2007)用于研究经口施用DFL23806对结肠炎的治疗作用。

[0099] 具体而言,使8至12周龄的雌性C57/B16小鼠经受饮用水中的2.5%右旋糖酐硫酸钠(DSS)(分子量,40kDa;MP Biomedicals)的3个经口周期,每个周期的特征在于7天的DSS施用,随后是7天的过滤纯化水。

[0100] DSS施用在处理之后1天立即诱导了疾病的临床体征,伴有紧密连接蛋白表达的变化以及促炎细胞因子表达的提高。在这些中度初始作用之后是越来越剧烈的症状,其在慢性模型中甚至更明显,如将在下文中描述的,所述症状包括肠渗透性提高、杯状细胞耗竭、

上皮糜烂和溃疡、以及严重出血。更具体地,目前经DSS诱导的结肠炎模型的特征在于急性和慢性阶段:急性临床症状(腹泻和/或严重地血便)与糜烂和炎症的存在相关。更重要地,最早的组织学变化表现为隐窝基底三分之一的丧失(在首次DSS施用之后第3天),其随时间进展直至整个隐窝丧失,在第5天导致糜烂。最早的变化是非常局灶性的,并且与炎症无关。炎症是继发现象(secondary phenomenon),并且仅在糜烂出现之后才变得明显。

[0101] 用DSS的多个周期随后是水的周期处理的动物发生具有以下组织学特征的慢性结肠炎:炎症和糜烂区域、无活性、隐窝畸变、鲜红上皮增生(flourid epithelial proliferation)和可能的发育异常。临床疾病活动性指数与疾病的急性阶段和慢性阶段二者中的病理学变化显著相关

[0102] (Chassaing,B,Current ProtoCols in Immunnology2014,104(1),Cooper,H.S et al,Laboratoty Investigation:a Journal of Technical MethodS and Pathology 1993,69(2),238-249,D' Alessio,S et al, Journal of Clinical Investigation 2014, 124(9),3863-3878)。

[0103] 从DSS施用的第3天开始,将小鼠分成4个实验组,每组接受以下指定的处理:

[0104] -组1:DSS(n=8)

[0105] 不处理,用作阴性对照。

[0106] -组2:DSS+载剂(n=8)

[0107] 用20%v/v二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide,DMSO)和80%v/v磷酸缓冲盐水(Phosphate Buffered Saline,PBS)、0.1M,pH 8(载剂)处理,用作阴性对照。

[0108] -组3:DSS+DFL 90mg/kg(n=8)

[0109] 用溶解于载剂中的DFL23806处理,剂量为90mg/kg,每天一次。

[0110] -组4:DSS+5-ASA 60mg/kg(n=8)

[0111] 用在载剂中的5-氨基水杨酸(5-ASA)处理,剂量为60mg/Kg,每天一次,用作参考阳性对照。

[0112] 每天在早晨,使用塑料无菌饲管20ga×30mm,通过经口管饲来施用载剂、DFL23806和5-ASA。所有小鼠在第39天处死。

[0113] b) 对体重减轻和DAI(疾病活动性指数)(Disease Activitv Index)评分的评估

[0114] DAI评分基于考虑了表征实验性结肠炎诱导和进展的不同参数的量表建立(R S Walmsley et al.Gut 1998;43:29-32)。

[0115] 每2天记录体重、排泄物(feces)中大量血液的存在和粪便(stool)稠度。具体而言,在每个时间点处通过对以下中的变化进行评分来确定DAI:体重减轻(0=无、1=1%至5%、2=5%至10%、3=10%至20%、4=>20%);粪便稠度(0=正常、2=稀的(loose)、4=腹泻);和直肠出血(0=正常、2=隐性出血、4=严重出血)。

[0116] 获得的结果表明,相对于对照(DSS组和DSS+载剂组),就降低体重减轻百分比(图1A)和降低DAI(图1B)二者方面而言,施用DFL23806早在第7天时就显示出显著作用。令人感兴趣的是,在某些时间点处发现DFL23806甚至比5-ASA更有效。

[0117] c) 结肠长度测量

[0118] 在第39天处死小鼠,收集每只小鼠的结肠并测量结肠长度,作为肠炎症的另外的参数。

[0119] 结果通过结肠长度得到了证实,表明了DFL23806和5-ASA与DSS+载剂组相比的显著抑制作用(图2)。

[0120] d) 内窥镜评价和评分

[0121] 处死当天(第39天),将小鼠用2%异氟烷麻醉并进行内窥镜检查,以确认炎症等级。实验性内窥镜检查设置(称为“Coloview系统”)由微型内窥镜(镜外径1.9mm)、氩光源、三芯片相机(triple chip camera)和实现小鼠结肠调节性充气的气泵(全部来自Karl Storz,Tuttlingen,Germany)组成。在彩色监测器上观察内窥镜操作,并如先前由D’Alessio博士(D’Alessio,S.et al.J.Clin.Invest.124,3863-3878;2014)所述,基于结肠半透明度(0至3分)、黏膜的颗粒状特征(0至3分)、血管分型的形态(0至4分)和纤维蛋白的存在(0至4分)来分配结肠炎严重程度的经修正的鼠内窥镜指数评分,从而导致0(无炎症体征)至16(非常严重的炎症的内窥镜体征)的累积评分。

[0122] 获得的综合内窥镜评分表明,与对照(DSS组和DSS+载剂组)相比,DFL23806和5-ASA能够以相当的方式显著抑制慢性实验性结肠炎(图3和4)。这不仅在综合内窥镜评分方面观察到(图4),而且对于结肠厚度(图5A)、血管分型(图5B)、可视化纤维蛋白(图6A)和黏膜表面颗粒度(图6B)也观察到。黏膜颗粒度提高表示水肿和小的糜烂。固有层水肿的特征在于中性粒细胞和毛细血管的聚集。这些数据表明,通过经口施用选择性GPR120激动剂(例如DFL23806)促进炎症消退可帮助降低中性粒细胞浸润和黏膜水肿。

[0123] e) 组织学评价和评分

[0124] 组织学分析由专业的病理学家以不知情的方式进行,以对肠炎进行分级。更具体地,使用用苏木精(Dako)和伊红(Diapath)染色的2 μ m石蜡包埋切片,对多个实验组中的结肠炎小鼠的结肠进行评价以用于组织学分析。不知情的病理学家使用RACHMILEWITZ评分(表1)(Rachmilewitz,D.et al.Gastroenterology 122,1428-1441;2002)对炎性细胞浸润和黏膜损伤的程度进行评价。

[0125] 如表1中所示,在不区分近端和远端结肠的情况下,该评分系统考虑了五个组织学参数:整个结肠切片中的溃疡、溃疡程度、flogosis、flogosis程度、以及纤维化。对于每个参数,分配(attribute)0至4的评分,如表1中所示。在目前的情况下,由于在经DSS诱导的慢性结肠炎模型(Rachmilewitz,D.et al.Gastroenterology 122,1428-1441;2002)中没有发生纤维化,因此未评价该参数。表1.Rachmilewitz评分

[0126]	溃疡	0	无溃疡
		1	黏膜受累
		2	黏膜+黏膜下层受累
		3	固有肌层受累
		4	整个壁受累
扩展溃疡		0	无溃疡
		1	点状
		2	极小的
		3	中度的
		4	广泛的
Flogosis	0	不存在	

	1	极小的
	2	轻度的
	3	中度的
	4	重度的
扩展flogosis	0	不存在
	1	黏膜
	2	黏膜+黏膜下层
	3	黏膜+黏膜下层+肌壁渗透
	4	整个壁
纤维化	0	不存在
	1	黏膜
	2	黏膜+黏膜下层
	3	黏膜+黏膜下层+肌壁渗透
	4	整个壁

[0127] 图7中的代表性组织学图像显示出DSS和DSS+载剂组中的深度溃疡、伴有隐窝丧失和大量炎性浸润。此外,结果证实了当与DSS+载剂相比时,DFL和5-ASA二者以相当的方式显著降低了溃疡、溃疡程度、flogosis和flogosis程度的组织学评分(图8)。

[0128] f) DFL与GPR120和GPR40结合的评价

[0129] 测试了DFL在活化GPR120和/或GPR40受体方面的效率。

[0130] 激动剂诱导的GPR120可参与多种信号传导途径以调节不同的生理结局。在配体结合之后, β -抑制蛋白(例如 β -抑制蛋白2)可以与GPR120的胞质结构域缔合,并将受体偶联至特定的下游信号传导途径(图9)。出于该原因,我们通过免疫沉淀验证了激动剂在活化GPR120和GPR40方面的效率。将来自每个实验组的6只小鼠的结肠裂解物(约900 μ g蛋白质)合并,将其用蛋白质A/G plus-琼脂糖(Santa Cruz)预清洁,并随后在4 $^{\circ}$ C下与用于免疫沉淀的抗体(抗GPR120或抗GPR40,Abcam)一起孵育16小时,随后与蛋白质A/G plus-琼脂糖一起孵育5小时。然后通过离心收集琼脂糖珠,将其用裂解缓冲液洗涤四次,并在添加Laemmli缓冲液之后加热至95 $^{\circ}$ C持续5分钟。通过SDS-PAGE分离所得的免疫沉淀物并用抗 β -抑制蛋白2抗体(Santa Cruz)进行探测。

[0131] 在western印迹之后,使用Image J对印迹进行密度分析。图10和图11显示出经免疫共沉淀的 β -抑制蛋白2与GPR120(图10)或GPR40水平(图11)之间的比率以及印迹的结果。

[0132] 结果显示出在第39天,DFL有效地活化了GPR120;事实上,与对照组或DSS+5-ASA 60mg/Kg组相比,DSS+DFL组中的GPR120与 β -抑制蛋白2之间的缔合更高(图10)。

[0133] 在用抗GPR40抗体进行免疫沉淀之后,结果显示出与仅用DSS或DSS+载剂处理的小鼠相比,DSS+DFL组中或DSS+5-ASA组中的GPR40与 β -抑制蛋白2的缔合没有提高(图11)。

[0134] 这证实了DFL23806是GPR120选择性激动剂,并且可通过 β -抑制蛋白途径介导信号传导。

[0135] 实施例2——GPR120激动剂在经口施用之后的药代动力学评价

[0136] 本研究的目的是在向小鼠单次经口施用以下化合物之后评价其的血浆和组织暴露:

- [0137] 7-(3-(N-(4-氟-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸(以下表示为DFL23806)、
- [0138] 7-(3-(N-(4-氯-2,6-二甲基苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸(以下表示为DFL23914)、
- [0139] 7-(3-(N-(2,6-二甲基-4-(三氟甲基)苯基)氨磺酰基)苯基)庚酸(以下表示为DFL23922)、
- [0140] 7-(3-(N-(6-氟-4-甲基-[1,1'-联苯基]-3-基)氨磺酰基)苯基)庚酸(以下表示为DFL23916)、
- [0141] 7-(3-(N-(5-氟-3-甲基-[1,1'-联苯基]-2-基)氨磺酰基)苯基)庚酸(以下表示为DFL23917)、
- [0142] 7-(3-([4-氟-2-甲基-5-(噻吩-2-基)苯基]氨磺酰基)苯基)庚酸(以下表示为DFL24102)。

[0143] 对于以上化合物中的每一种,用55mg/kg溶解于载剂中的测试化合物(针对纯度进行调整)通过胃管饲对在处理期开始时年龄为约6/7周的九只雄性CD1小鼠进行经口处理,所述载剂由20%v/v二甲基亚砷(DMSO)和80%v/v磷酸缓冲盐水(PBS),0.1M,pH 8组成。

[0144] 在给药之前或给药之后的30分钟、1小时、2小时、6小时、8小时和24小时(三只小鼠/时间点)进行眶后综合血液取样,以用于血浆药代动力学评估。将血液样品收集在肝素化的收集管中。立即将样品放至冰上,并保持冷却直至离心(在约+4°C下10000g持续3分钟)。将约50 μ L的血浆储存在-80°C的冰箱中等待分析。

[0145] 所有动物操作(包括饲养、健康监测、限制、给药等)和伦理修订均是根据现行意大利法规(2014年3月4日n.26立法法令)进行的,该法规执行了关于保护用于生物医学研究的动物的2010/63/UE指令。

[0146] 在进行样品收集之后,使用HPLC-MS/MS方法对测试化合物的浓度进行生物分析,并使用Watson系统(v 7.6,Thermo Fisher Scientific Waltham,MA,USA)根据标准非房室方法(non-compartmental approach)依据平均浓度数据进行血浆和组织中化合物的药代动力学分析。

[0147] 下表中总结了针对每种经测试化合物获得的药代动力学参数:

[0148] 表2. 在经口施用之后小鼠中的药代动力学参数

编码	剂量_PO (mg/kg)	T1/2(小时)	T最大(小时)	C最大 (ng/mL)	AUC_最后 (ng/mL*小时)	AUC_无穷 (ng/mL*小时)
DFL23806	90.0	5.8	0.50	106	354	405
DFL23916	15.0	2.2	0.4	198	480	571
DFL23914	10.0	1.2	2	45	189	230

[0149]

DFL23922	15.0	1.5	1.4	123	201	217
DFL23917	15.0	1.3	0.5	135	378	402
DFL24102	15.0	1.9	1	113	278	302

[0150] 在雄性瑞士白化小鼠中,在单剂量经口施用DFL23806 90mg/kg之后,评价了DFL23806在近端和远端结肠中的生物分布。

[0151] 下表中总结了所获得的结果:

[0152] 在P0 (90.0mg/kg) 剂量施用于雄性瑞士白化小鼠之后DFL23806的结肠浓度 (ng/g)。

时间 (小时)	平均值 (ng/g)	标准偏差
1.00	68.28	37.38
4.00	3567.22	5018.47

[0154] 在P0 (90.0mg/kg) 剂量施用于雄性瑞士白化小鼠之后DFL23806的结肠/血浆比率。

时间 (小时)	平均值	标准偏差
1.00	1.63	1.60
4.00	64.20	60.70

[0156] 如从表中可以看出的,结肠中的DFL23806浓度比在血浆中测量的相应DFL23806浓度更高 (比率=64.2)。

[0157] 这些结果表明所测试的化合物集中在结肠中,从而局部地发挥其活性。

[0158] 实施例3——GPR120在活化之后的内化

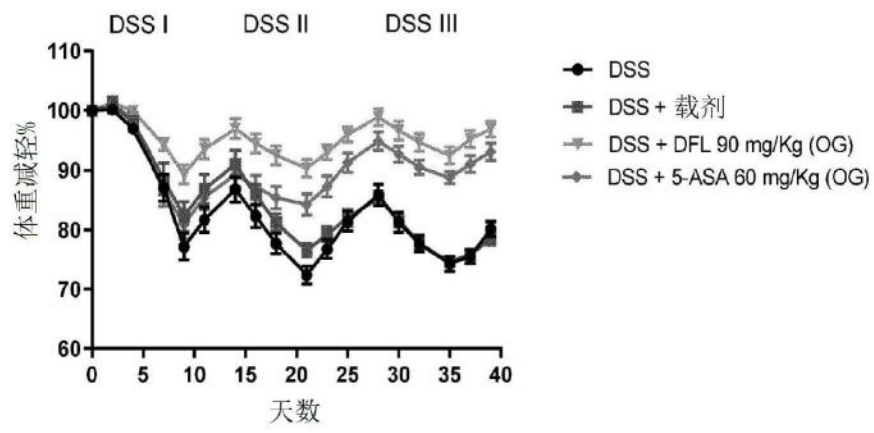
[0159] 我们使用由DiscoverX开发的使用 β -半乳糖苷酶的酶片段互补 (Enzyme Fragment Complementation, EFC) 技术,在浓度高至100 μ M的剂量响应曲线中评价了人GPR120在被化合物DFL23806、DFL23916、DFL23914、DFL23922、DFL23917和DFL24102活化之后的内化。结果表明,对于所有的测试化合物,活化受体所需的GPR120激动剂的浓度显著低于导致GPR120内化和随后的降解的浓度。特别地,DFL23806具有3.9 μ M的AC₅₀,并且激活人GPR120受体的内化,其中在100 μ M下的效力为59.1%。

[0160] 活化与内化的AC₅₀值之间的显著差异表明,受体在结合化合物之后并未被立即内化,并因此用根据本发明的GPR120激动剂处理不会导致受体的下调。

[0161] 在现有技术中已知的其他GPR120激动剂中未发现该特征。例如,关于分子TUG-891和GW9508的数据揭示了活化和内化的AC₅₀值是相似的 (对于TUG-891分别为0.065 μ M和0.051 μ M,以及对于GW9508分别为6.8 μ M和9.6 μ M)。

[0162] 这些浓度表明,受体在结合这些化合物中的任一者之后快速内化和转换。由本发明的GPR120激动剂介导的受体内化延迟提高了作用效力,因为活化的GPR120能够参与长时间的信号转导。

A



B

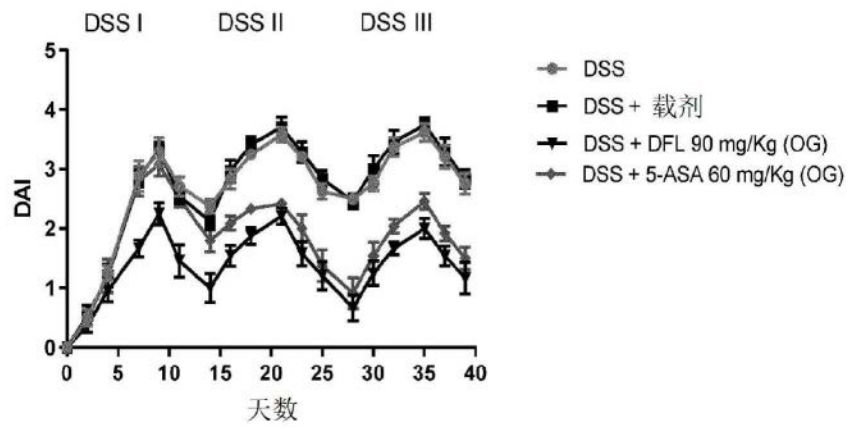


图1

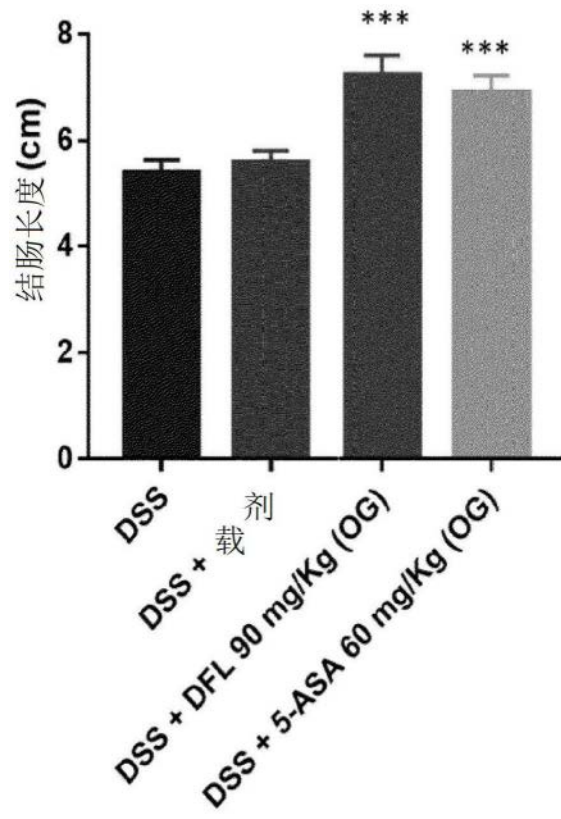


图2

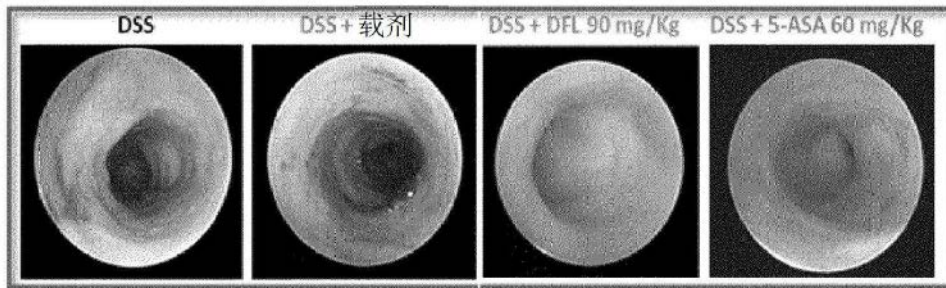


图3

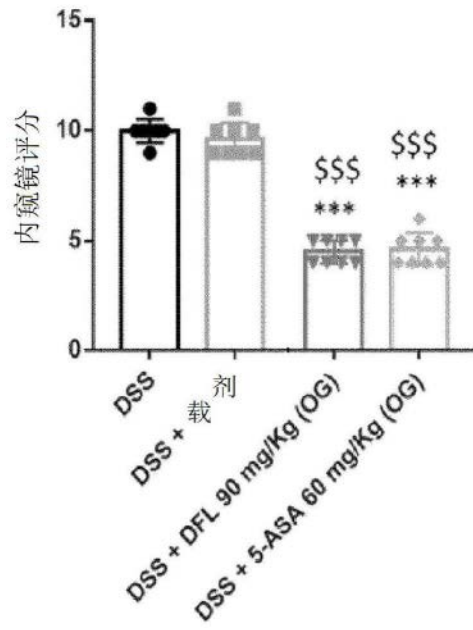


图4

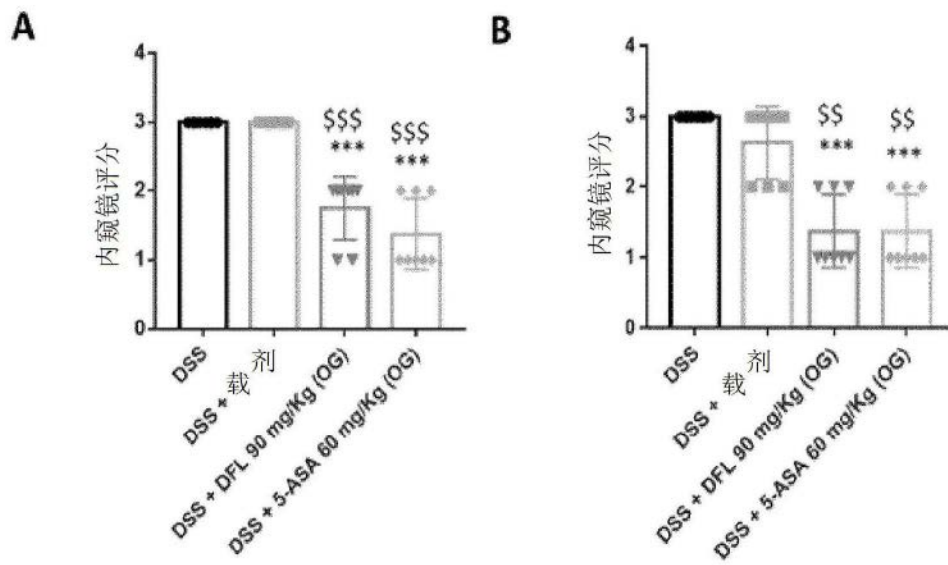


图5

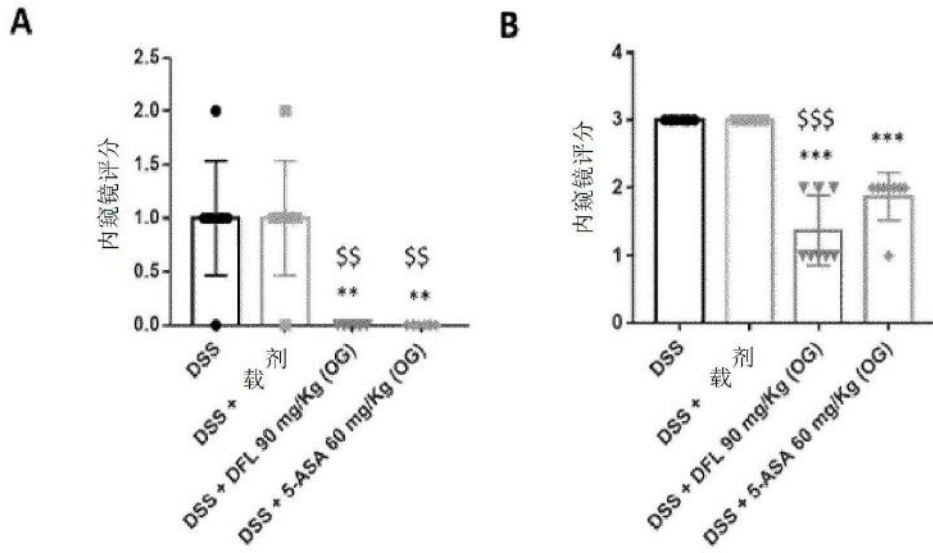


图6

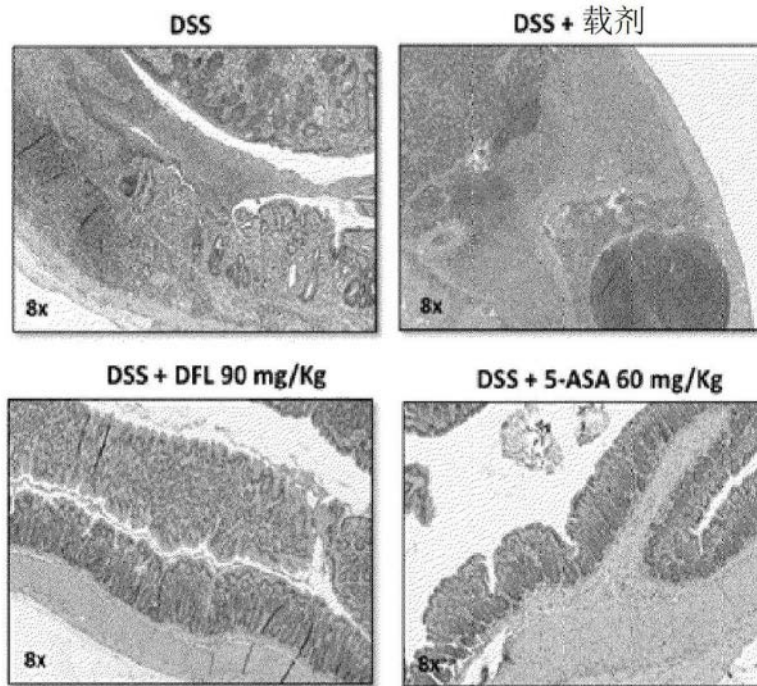


图7

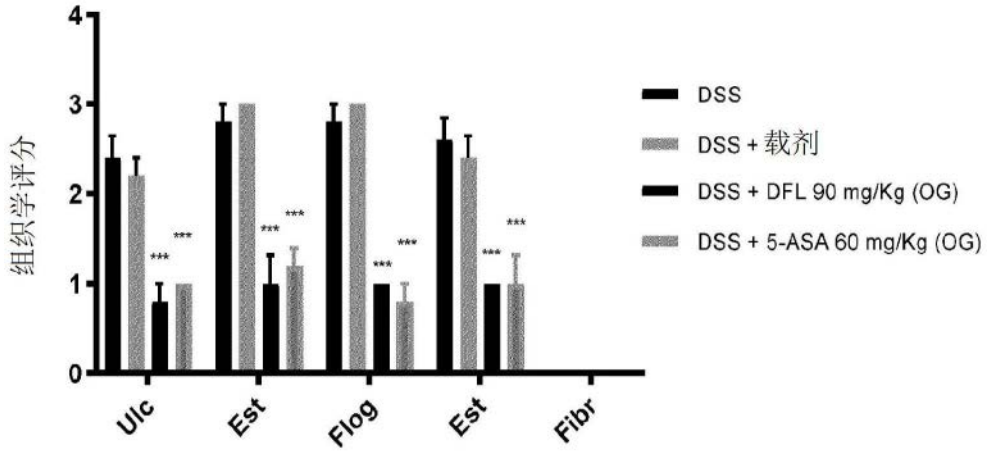


图8

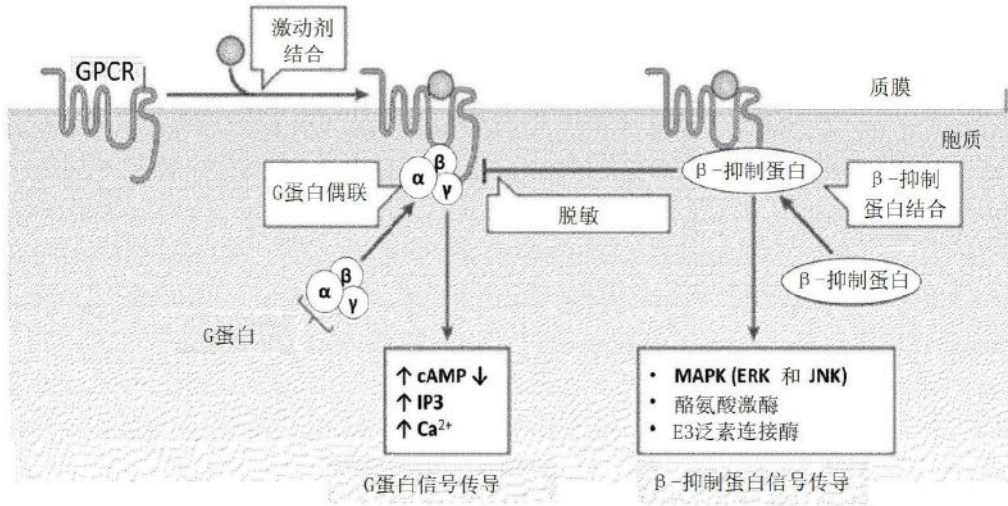


图9

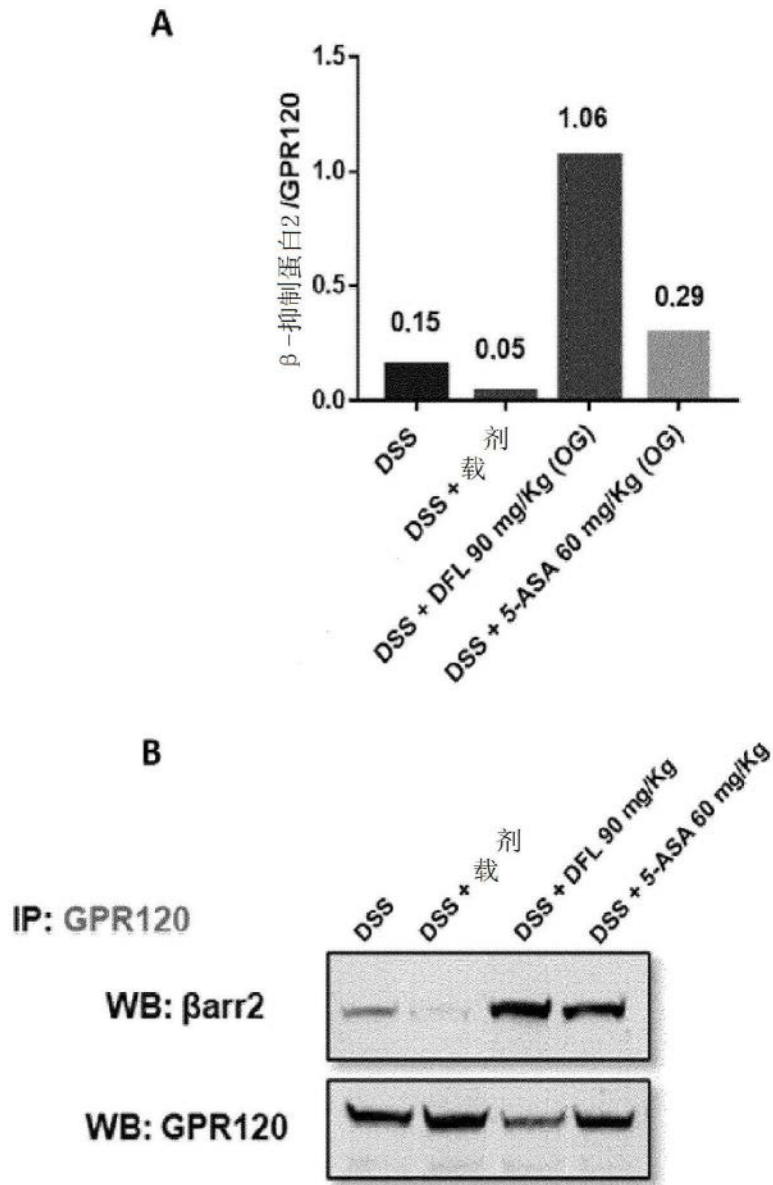


图10

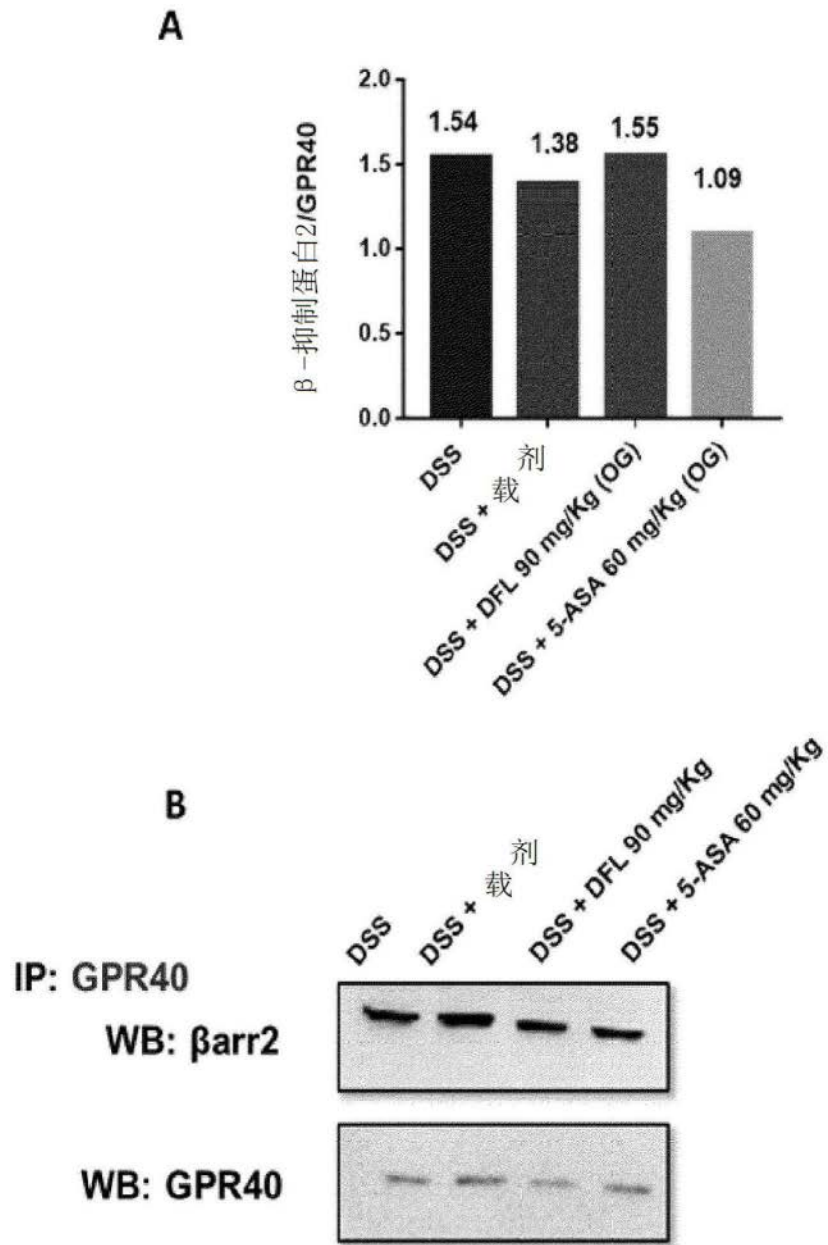


图11