



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115666558 A

(43) 申请公布日 2023. 01. 31

(21) 申请号 202180035760.4

大藪巨树

(22) 申请日 2021.05.20

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(30) 优先权数据

2020-089196 2020.05.21 JP

2020-134338 2020.08.07 JP

(51) Int. Cl.

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07D 235/26 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07J 9/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/019088 2021.05.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/235508 JA 2021.11.25

(71) 申请人 盐野义制药株式会社

地址 日本大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72) 发明人 雪冈日出男 岛崎淳行 滨田忠辉

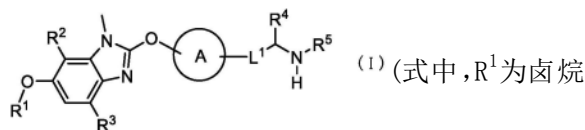
权利要求书14页 说明书52页 附图11页

(54) 发明名称

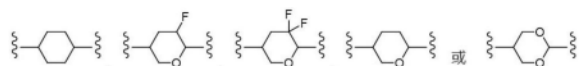
脂肪性肝病的治疗用药物

(57) 摘要

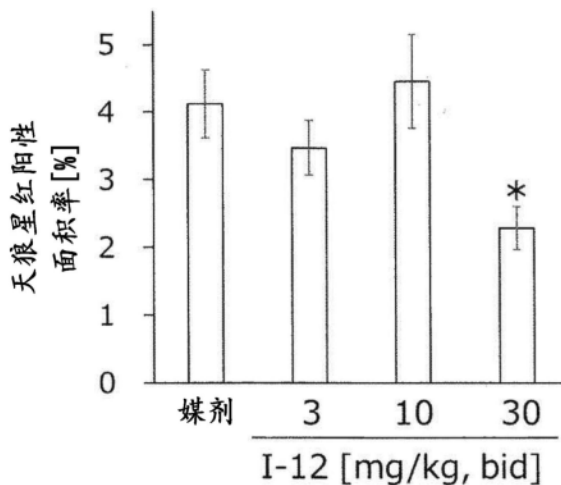
本发明提供具有优良ACC2选择性抑制作用,不会伴随血浆甘油三酯上升或血小板浓度的降低等副作用,而用于脂肪性肝病,尤其非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防的药物组合物。一种用于治疗和/或预防脂肪性肝病的药物组合物,其含有式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐,该式(I)如下:



基或非芳香族碳环式基,R2为氢原子或卤素,R3为卤素,环A为式:

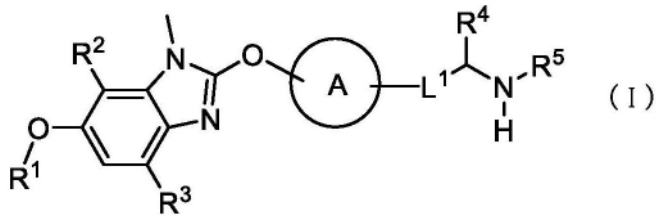


所示的基,-L1-为-O-(CH2)-、-(CH2)2-等,R4为烷基或卤烷基,R5为烷基羰基或氨甲酰基。)



1. 一种用于治疗和/或预防脂肪性肝病的药物组合物,其含有式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐,其中该式(I)如下:

【化学式1】



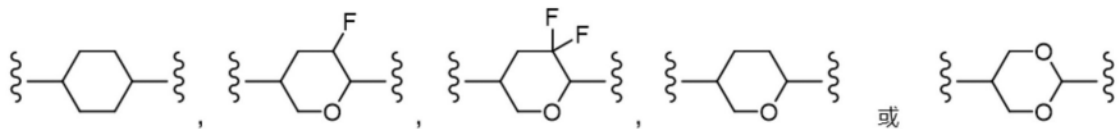
式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

环A为式:

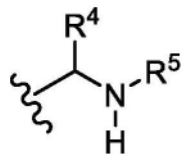
【化学式2】



所示的基;

$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-CF_2-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$, 其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式3】



所示的基键合;

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物, 其中 R^2 为氢原子。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的药物组合物, 其中环A为下式所示的基,

【化学式4】

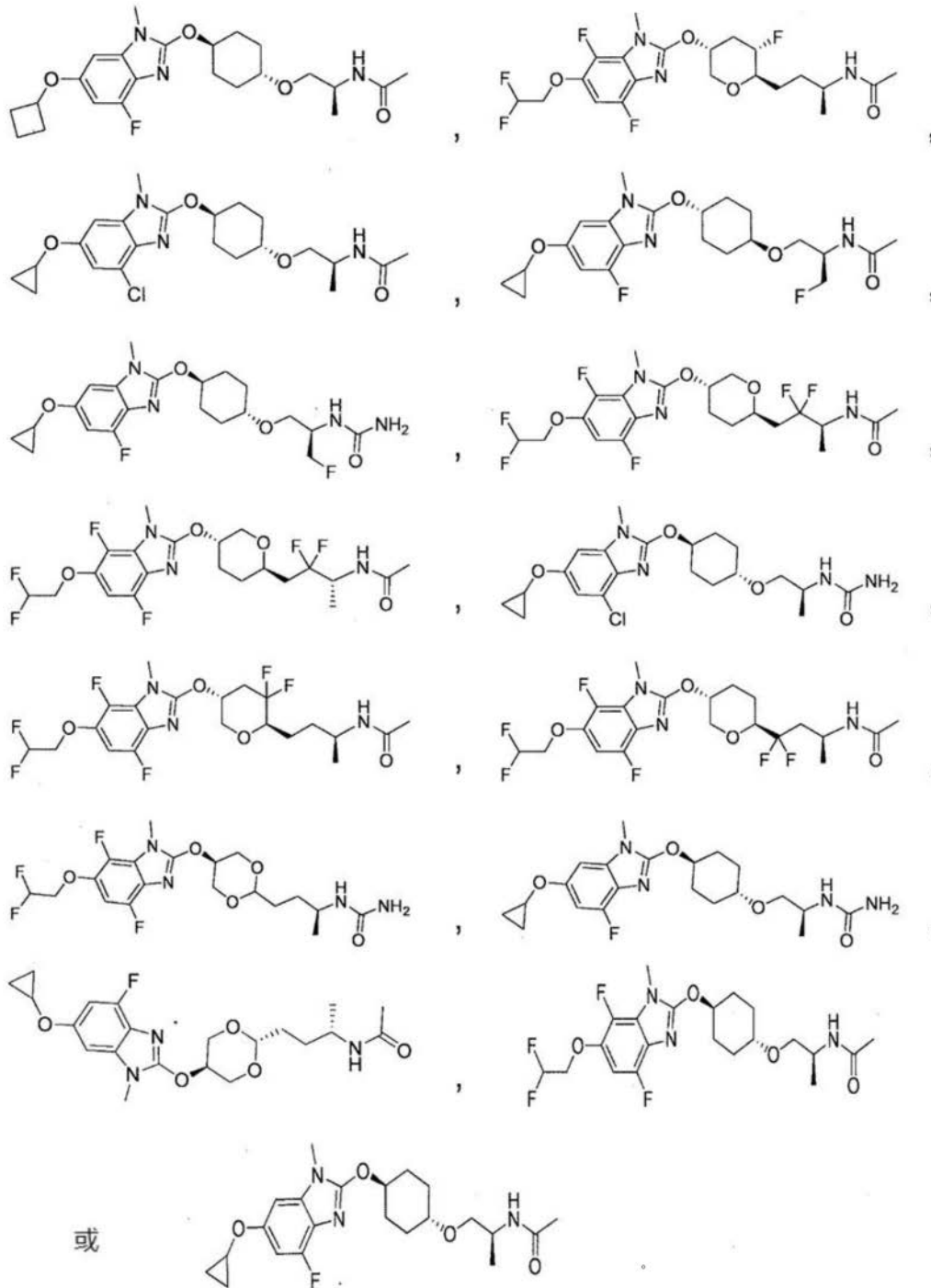


5. 根据权利要求1至4中任一项所述的药物组合物, 其中 $-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的药物组合物, 其中 R^4 为烷基。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的药物组合物, 其中 R^5 为甲基羰基或氨甲酰基。

8. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐, 【化学式5】



9. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

10. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

11. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

12. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。

13. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌 (HCC)。

14. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中不会因为该药物组合物的施用而伴随血浆

甘油三酯上升的副作用。

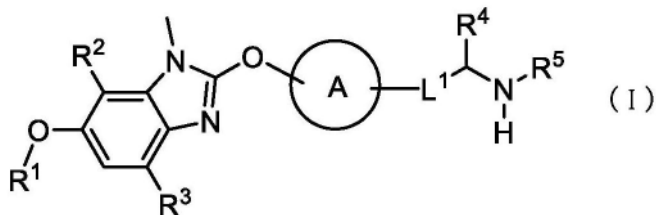
15. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中不会因为该复合肥组合物的施用而伴随心血管病的副作用。

16. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中通过该复合肥组合物的施用,可改善胰岛素抵抗。

17. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中不会因该复合肥组合物的施用而伴随血小板浓度降低的副作用。

18. 一种脂肪性肝病的治疗和/或预防方法,其包含将式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的有效量施用至需要脂肪性肝病的治疗和/或预防的个体的步骤,其中该式(I)如下:

【化学式6】



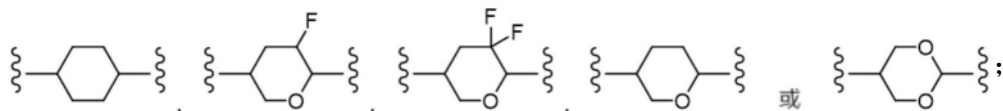
式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

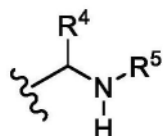
环A为下式所示的基,

【化学式7】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$, 其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式8】



所示的基键合;

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。

19. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

20. 根据权利要求18或19所述的治疗和/或预防方法,其中 R^2 为氢原子。

21. 根据权利要求18至20中任一项所述的治疗和/或预防方法,其中环A为下式所示的基,

【化学式9】



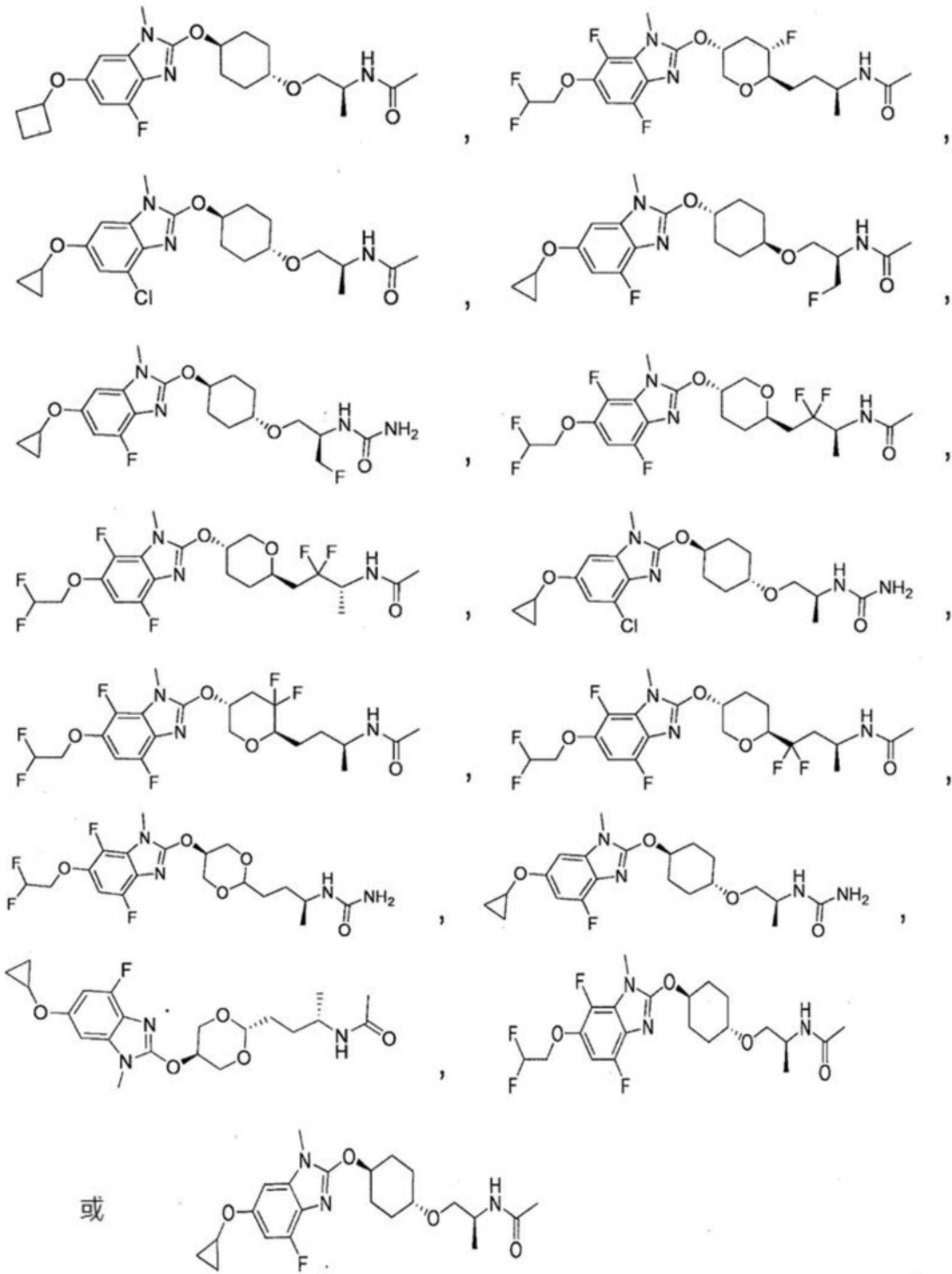
22. 根据权利要求18至21中任一项所述的治疗和/或预防方法,其中-L¹-为-O-(CH₂)-或-(CH₂)₂-。

23. 根据权利要求18至22中任一项所述的治疗和/或预防方法,其中R⁴为烷基。

24. 根据权利要求18至23中任一项所述的治疗和/或预防方法,其中R⁵为甲基羰基或氨甲酰基。

25. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐,

【化学式10】



26. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

27. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

28. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

29. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。

30. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌(HCC)。

31. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中不会因式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血浆甘油三酯上升的副作用。

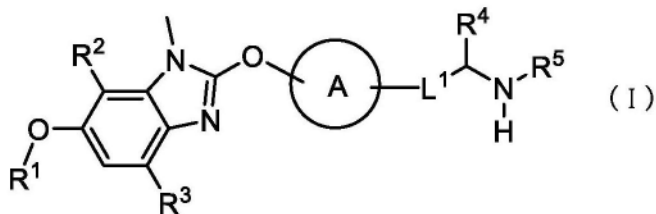
32. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中不会因式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随心血管病的副作用。

33. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中通过式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用,可改善胰岛素抵抗。

34. 根据权利要求18所述的治疗和/或预防方法,其中不会因式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血小板浓度降低的副作用。

35. 式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于脂肪性肝病的治疗和/或预防的药物中的用途,其中该式(I)如下:

【化学式11】



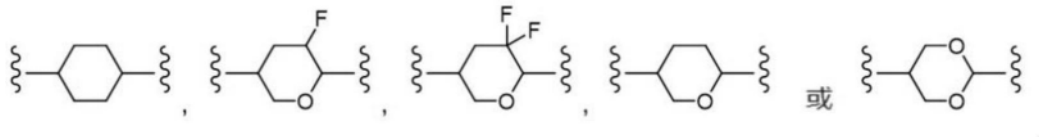
式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

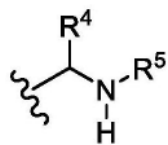
环A为下式所示的基,

【化学式12】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$, 其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式13】



所示的基键合;

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。

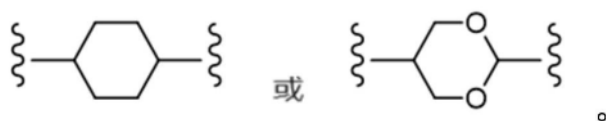
36. 根据权利要求35所述的用途,其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

37. 根据权利要求35或36所述的用途,其中 R^2 为氢原子。

38. 根据权利要求35至37中任一项所述的用途,其中

环A为下式所示的基，

【化学式14】



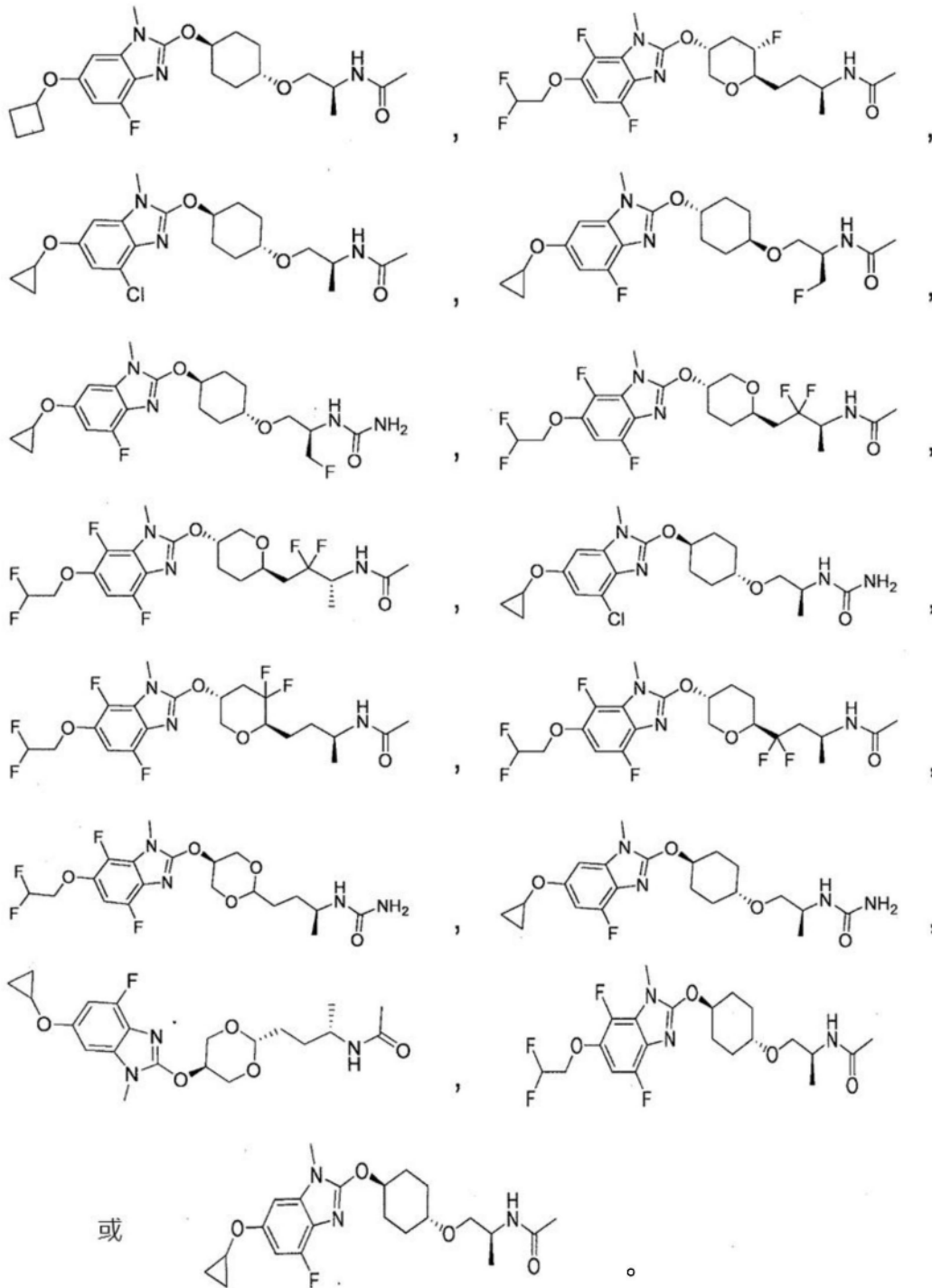
39. 根据权利要求35至38中任一项所述的用途，其中 $-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

40. 根据权利要求35至39中任一项所述的用途，其中 R^4 为烷基。

41. 根据权利要求35至40中任一项所述的用途，其中 R^5 为甲基羰基或氨甲酰基。

42. 根据权利要求35所述的用途，其中式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐，

【化学式15】



43. 根据权利要求35所述的用途,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。
44. 根据权利要求35所述的用途,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。
45. 根据权利要求35所述的用途,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。
46. 根据权利要求35所述的用途,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。
47. 根据权利要求35所述的用途,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌 (HCC)。
48. 根据权利要求35所述的用途,其中不会因式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血浆甘油三酯上升的副作用。
49. 根据权利要求35所述的用途,其中不会因式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的

盐的施用而伴随心血管病的副作用。

50. 根据权利要求35所述的用途,其中通过式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用,可改善胰岛素抵抗。

51. 根据权利要求35所述的用途,其中不会因式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血小板浓度降低的副作用。

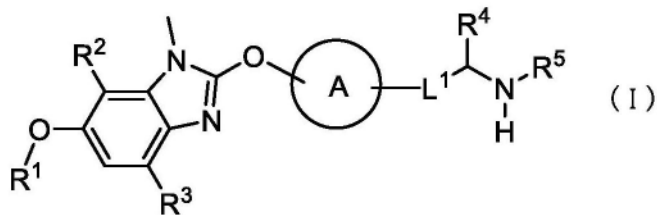
52. 一种药物组合物,其含有:

式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐,及

选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐;

其中该式(I)如下:

【化学式16】



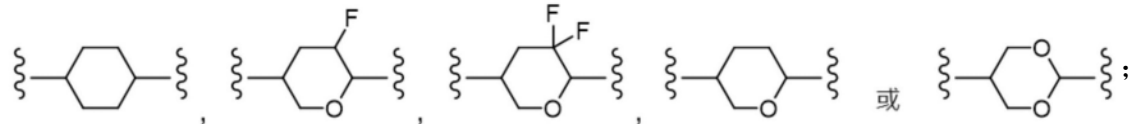
式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

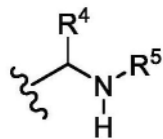
环A为下式所示的基,

【化学式17】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$, 其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式18】



所示的基键合;

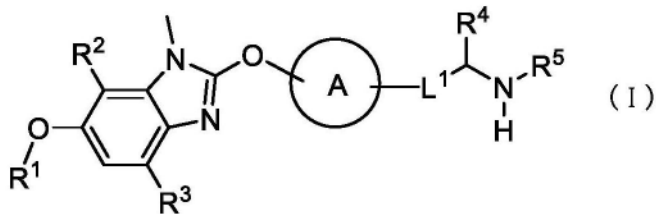
R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。

53. 一种药物组合物,其含有用于与式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐并用而施用的选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐;

其中式(I)如下:

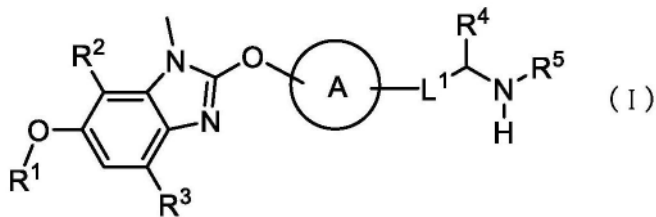
【化学式19】



式中,各记号与权利要求52中意义相同。

54. 一种药物组合物,其含有用于与选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐并用而施用的式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐,其中式(I)如下:

【化学式20】



式中,各记号与权利要求52中意义相同。

55. 根据权利要求52至54中任一项所述的药物组合物,其中R¹为非芳香族碳环式基。

56. 根据权利要求52至55中任一项所述的药物组合物,其中R²为氢原子。

57. 根据权利要求52至56中任一项所述的药物组合物,其中环A为下式所示的基,

【化学式21】



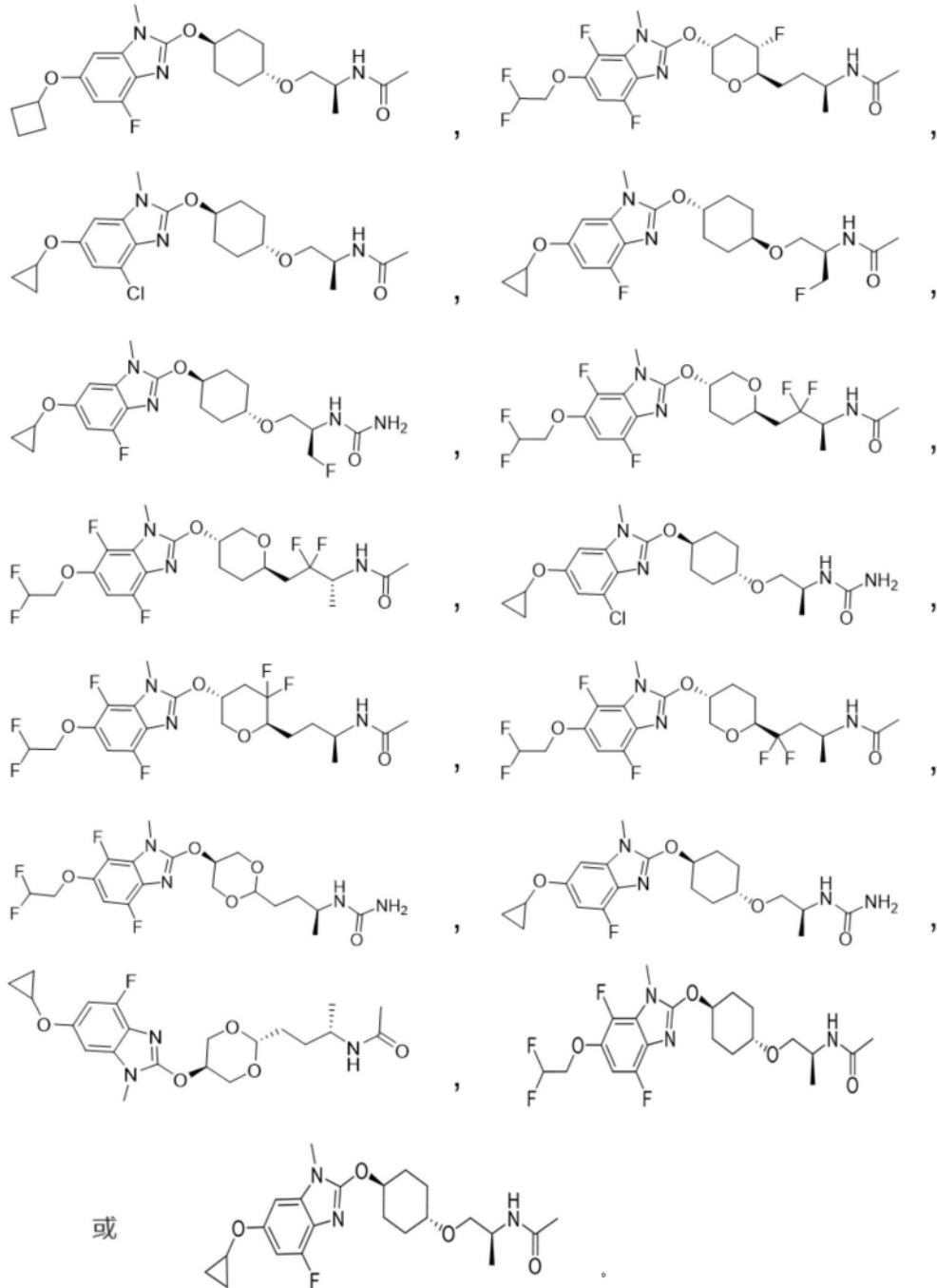
58. 根据权利要求52至57中任一项所述的药物组合物,其中-L¹-为-O-(CH₂)-或-(CH₂)₂-。

59. 根据权利要求52至58中任一项所述的药物组合物,其中R⁴为烷基。

60. 根据权利要求52至59中任一项所述的药物组合物,其中R⁵为甲基羰基或氨甲酰基。

61. 根据权利要求52至54中任一项所述的药物组合物,其中式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐,

【化学式22】



62. 根据权利要求52至54中任一项所述的药物组合物,其用于治疗 and/或预防脂肪性肝病。

63. 根据权利要求62所述的药物组合物,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

64. 根据权利要求62所述的药物组合物,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

65. 根据权利要求62所述的药物组合物,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

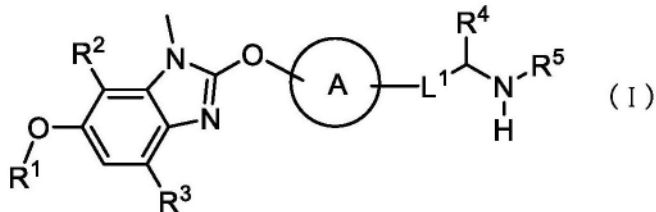
66. 根据权利要求62所述的药物组合物,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。

67. 根据权利要求62所述的药物组合物,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌 (HCC)。

68. 一种脂肪性肝病的治疗和/或预防方法, 其为将式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐, 及选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐组合施用;

其中式(I)如下:

【化学式23】



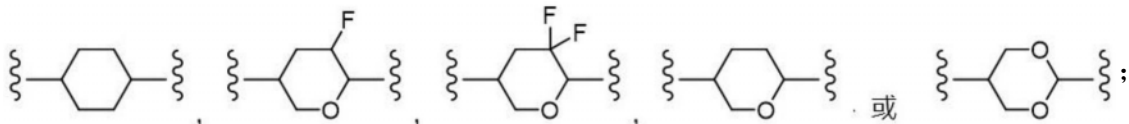
式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

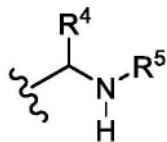
环A为下式所示的基,

【化学式24】



$-L^1-$ 为 $-O-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$, 其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式25】



所示的基键合;

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。

69. 根据权利要求68所述的治疗和/或预防方法, 其中

R^1 为非芳香族碳环式基。

70. 根据权利要求68或69所述的治疗和/或预防方法, 其中

R^2 为氢原子。

71. 根据权利要求68至70中任一项所述的治疗和/或预防方法, 其中环A为下式所示的基,

【化学式26】



72. 根据权利要求68至71中任一项所述的治疗和/或预防方法, 其中 $-L^1-$ 为 $-O-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

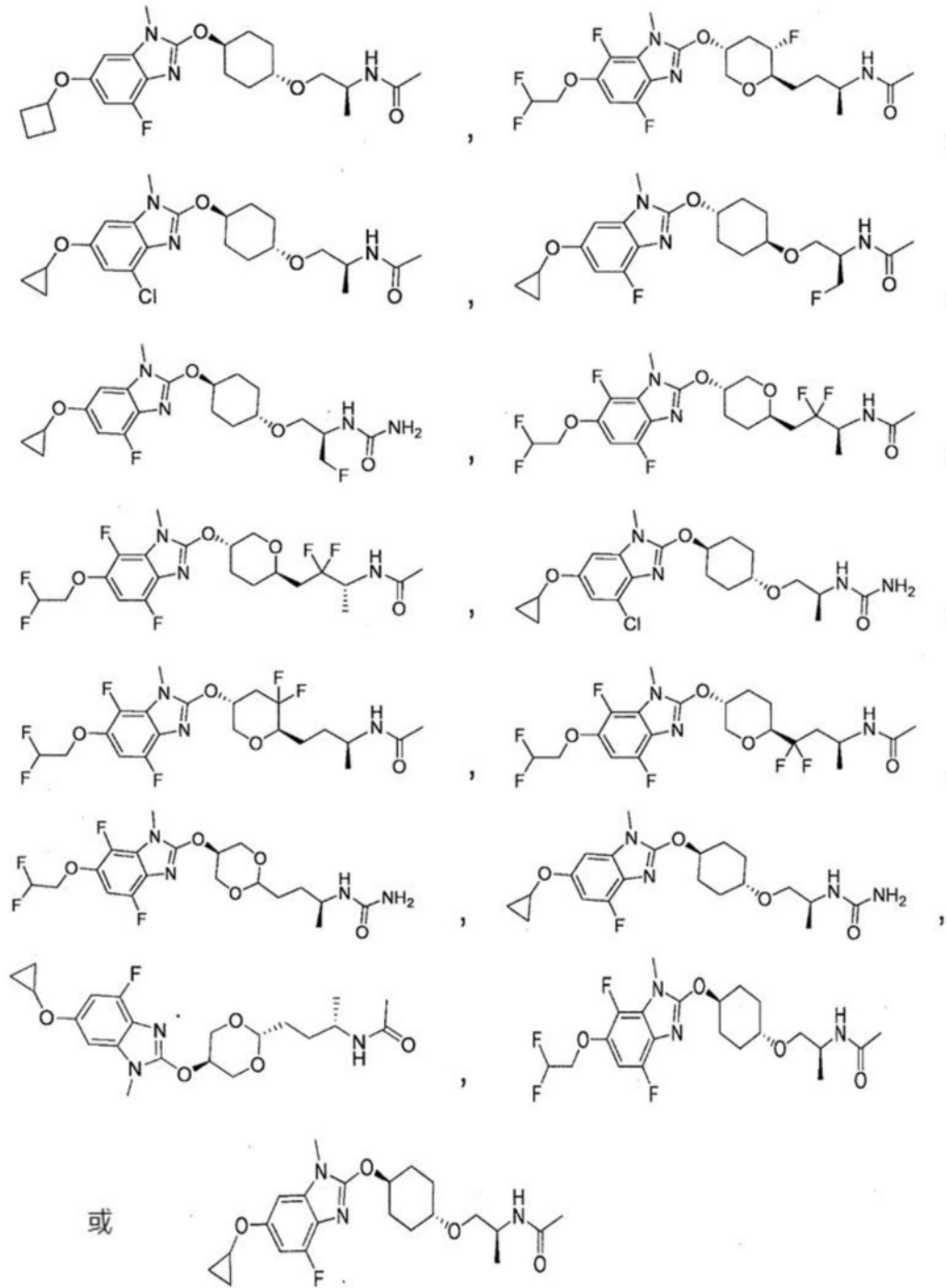
73. 根据权利要求68至72中任一项所述的治疗和/或预防方法,其中R⁴为烷基。

74. 根据权利要求68至73中任一项所述的治疗和/或预防方法,其中R⁵为甲基羰基或氨甲酰基。

75. 根据权利要求68所述的治疗和/或预防方法,其中

式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐,

【化学式27】



76. 根据权利要求68所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

77. 根据权利要求68所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

78. 根据权利要求68所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

79. 根据权利要求68所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。

80. 根据权利要求68所述的治疗和/或预防方法,其中该脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌 (HCC)。

脂肪性肝病的治疗用药物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗 and/或预防脂肪性肝病,尤其非酒精性脂肪肝病的新颖药物组合物。

背景技术

[0002] 肝病为世界中的主要死因。肝病可因感染、伤害;暴露于药物或毒性化合物、酒精、食物中的杂质;以及血液中的正常物质的异常蓄积、自体免疫过程、基因缺损(血铁沉积症(hemochromatosis)等)或未知的原因(可复数)而引起。肝病一般根据病的期间,分类为急性或慢性。

脂肪性肝病为在肝脏内的中性脂肪蓄积,引起肝损伤的病的总称。肝脏的组织中,伴随脂肪滴的肝细胞占30%以上的情况被称为脂肪肝。

脂肪肝为肝脏内中性脂肪蓄积的状态,由于肝脏内的脂肪蓄积为非进行性(可逆性)变化,若将病因除去,则肝脏内的脂肪蓄积回复正常。然而,若脂肪的蓄积进行,产生肝功能损伤,则有时会发展成肝硬化或肝癌。饮酒引起的酒精性脂肪性肝炎(alcoholic steatohepatitis;ASH)为脂肪肝的典型例。

另一方面,亦有几乎不摄取酒精的人会发生脂肪肝的情况,此称为非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease:NAFLD)。NAFLD中的严重者,称为非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steato-hepatitis:NASH)。可以认为NASH为肝硬化或肝癌的重要原因。

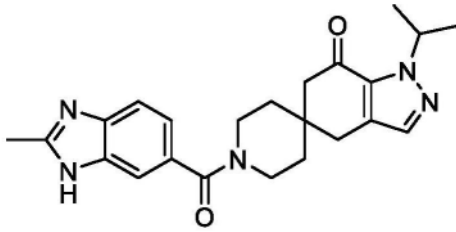
酒精性及非酒精性两者的肝炎的组织影像类似,正研究肝脏内的氧化压力等共通的发病机制。

若依据美国肝脏协会,超出20%的人口患有非酒精性脂肪肝病(NAFLD)。如果不及时治疗,则NAFLD会发展成非酒精性脂肪性肝炎(NASH)而引起严重的不良影响。再者,NASH在未治疗的情况,有导致肝纤维化、肝硬化症、肝衰竭、或肝细胞癌的可能性。在美国约有1600万成人患有NASH,其中大约50%患有NASH相关的进行性肝纤维化(交联状纤维化或肝硬化)。根据这些数据,预计到2020年NASH将成为肝移植的主要适应症。NASH的特征在于脂肪症的存在以及其他特性,包含肝细胞性变性(气球状、马洛氏小体(Mallory hyaline))、炎症性细胞浸润及进行性纤维化的发展。

现今没有被核准用于治疗NASH的疗法,也没有使NASH患者中的纤维化和/或脂肪症减低的疗法。因此,仍然需要提供治疗肝病或肝病的症状用的新颖有效药剂。

[0003] 专利文献1中,记载非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和/或原发性胆汁性肝硬化的治疗和/或预防方法,该方法包含将含有二十碳五烯酸或这些的衍生物的药物组合物施用至需要其的对象。据报导,奥贝胆酸(obeticholic acid)是一种半合成胆汁酸,是作用于核内受体FXR(farnesoid X receptor)的激动剂,已在欧美申请用于NASH所引发的纤维化。

[0004] ACC为将乙酰辅酶A羧化为丙二酰辅酶A的酶,参与脂肪酸的代谢。ACC方面,存在2个同工型(isoform),亦即乙酰辅酶A羧化酶1(以下,称为ACC1)及ACC2。



据报导,这是由于通过抑制骨髓的ACC1而抑制脂肪酸合成,从而导致血小板的生成降低。

[0007] 在专利文献5及6中,记载特异地抑制ACC2的苯并咪唑衍生物,然而未记载其在非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防上有效。

如以上所述,具有ACC2选择性抑制作用而可用于非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防的药物组合物尚未为人所知。

背景技术文献

专利文献

[0008] 专利文献1美国申请公开公报2014/187633号

专利文献2国际公开第2013/071169号

专利文献3国际公开第2016/112305号

专利文献4国际公开第2011/058474号

专利文献5国际公开第2015/056782号

专利文献6国际公开第2016/159082号

发明内容

发明所要解决的课题

[0009] 本发明的课题为提供具有优良ACC2选择性抑制作用,不会伴随血浆甘油三酯上升或血小板浓度降低等副作用,而可用于脂肪性肝病、尤其非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防的药物组合物。

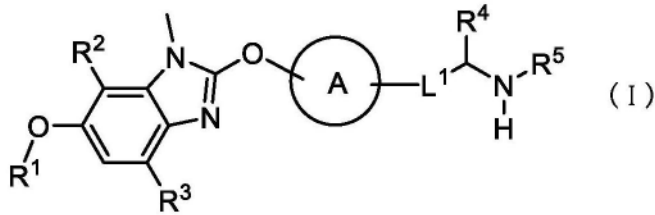
用于解决课题的方法

[0010] 本发明人等为了解决前述课题进行深入研究的结果,发现专利文献5及6所记载的具有ACC2选择性抑制作用的化合物中,特定的化合物(ACC2的选择性高,且代谢稳定性优良的化合物)在非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防上有效,且不会伴随血浆甘油三酯上升或血小板浓度降低等副作用,于是完成了本发明。本发明的ACC2选择性抑制剂,可避免ACC1抑制所致的副作用,而抑制全身的ACC2。其结果,本发明的ACC2选择性抑制剂,与ACC1/2的双重抑制剂及如菲耳索科司塔特(firsocostat)的肝脏选择性ACC1/2的双重抑制剂不同,不引起血小板降低,不使血浆甘油三酯浓度上升,可发挥胰岛素抵抗改善,以及基于全身的ACC2抑制的代谢改善作用。本发明涉及下列项目。

[0011] (1)

一种用于治疗 and/或预防脂肪性肝病的药物组合物,其含有式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式3】



(式中,

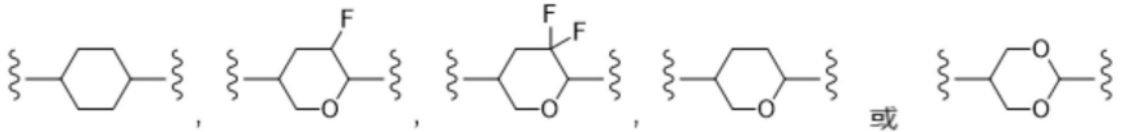
R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

环A为式:

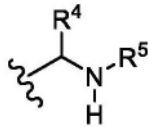
【化学式4】



所示的基;

$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中,左侧的键与环A键合,右侧的键与式:

【化学式5】



所示的基键合。);

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(2) 如上述项目(1)记载的药物组合物,其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

(3) 如上述项目(1)或(2)记载的药物组合物,其中 R^2 为氢原子。

(4) 如上述项目(1)至(3)中任一项记载的药物组合物,其中环A为下式所示的基:

【化学式6】



(5) 如上述项目(1)至(4)中任一项记载的药物组合物,其中 $-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

(6) 如上述项目(1)至(5)中任一项记载的药物组合物,其中 R^4 为烷基。

(7) 如上述项目(1)至(6)中任一项记载的药物组合物,其中 R^5 为甲基羰基或氨甲酰基。

(8) 如上述项目(1)记载的药物组合物,其中式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式7】

(14) 如上述项目 (1) 记载的药物组合物, 其中前述药物组合物的施用, 不会伴随血浆甘油三酯上升的副作用。

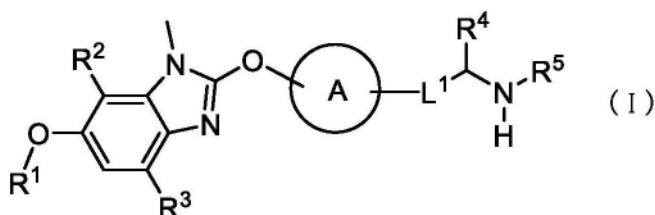
(15) 如上述项目 (1) 记载的药物组合物, 其中前述药物组合物的施用, 不会伴随心血管病的副作用。

(16) 如上述项目 (1) 记载的药物组合物, 其中前述药物组合物的施用, 可改善胰岛素抵抗。

(17) 如上述项目 (1) 记载的药物组合物, 其中前述药物组合物的施用, 不会伴随血小板浓度降低的副作用。

(18) 一种脂肪性肝病的治疗和/或预防方法, 其包含将式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐的有效量施用至需要脂肪性肝病的治疗和/或预防的个体的步骤, 其中该式 (I) 如下:

【化学式8】



(式中,

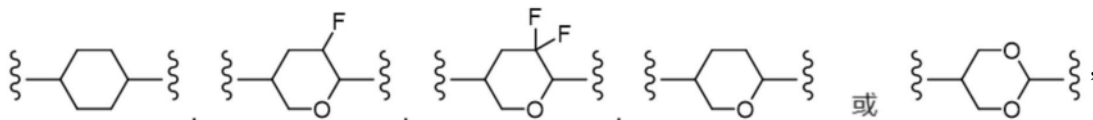
R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

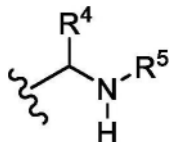
环A为下式所示的基:

【化学式9】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式10】



所示的基键合。);

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(19) 如上述项目 (18) 记载的治疗和/或预防方法, 其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

(20) 如上述项目 (18) 或 (19) 记载的治疗和/或预防方法, 其中 R^2 为氢原子。

(21) 如上述项目 (18) 至 (20) 中任一项记载的治疗和/或预防方法, 其中环A为下式所示的基:

【化学式11】



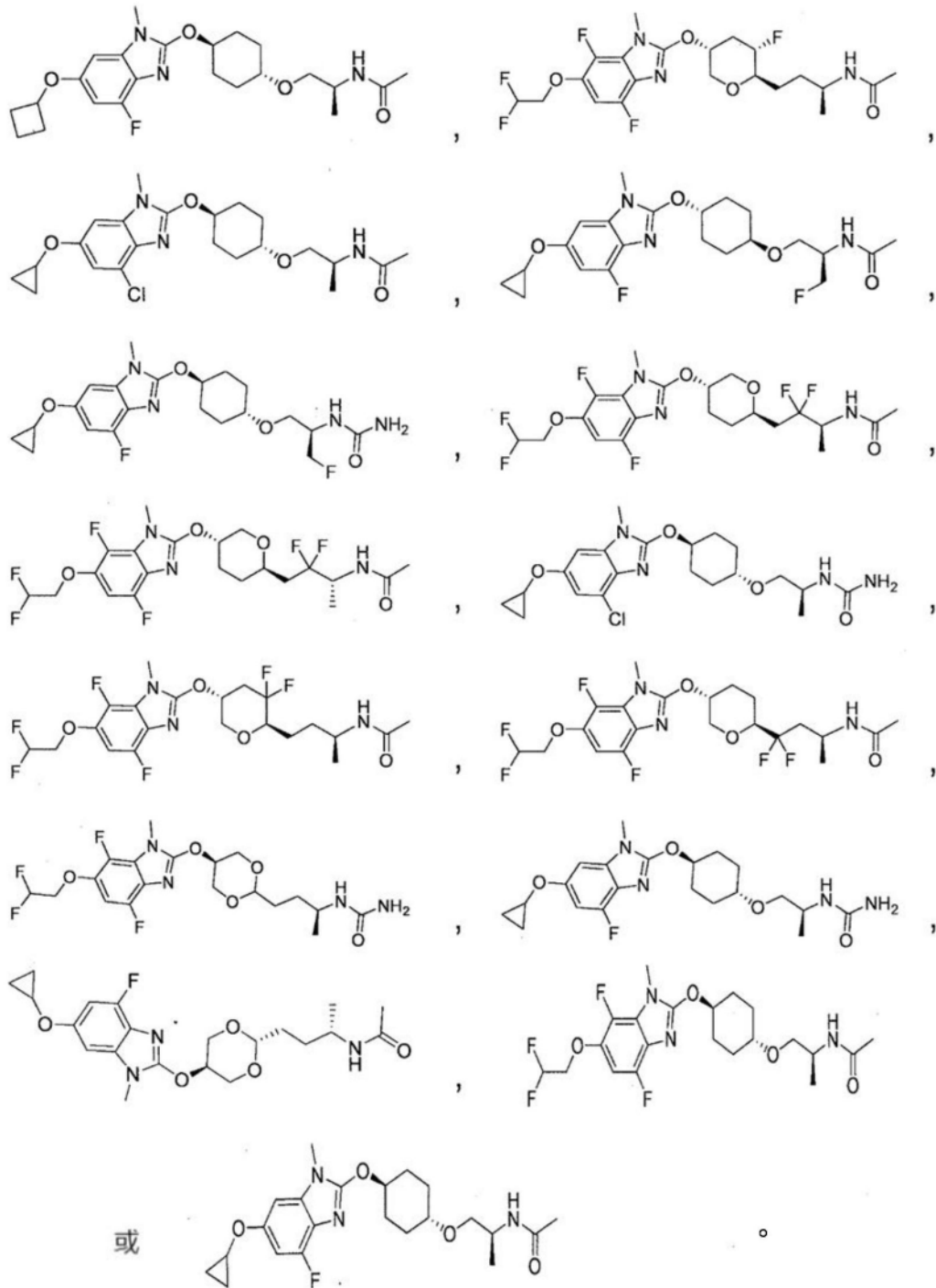
(22) 如上述项目 (18) 至 (21) 中任一项记载的治疗和/或预防方法,其中-L¹-为-O-(CH₂)-或-(CH₂)₂-。

(23) 如上述项目 (18) 至 (22) 中任一项记载的治疗和/或预防方法,其中R⁴为烷基。

(24) 如上述项目 (18) 至 (23) 中任一项记载的治疗和/或预防方法,其中R⁵为甲基羰基或氨甲酰基。

(25) 如上述项目 (18) 记载的治疗和/或预防方法,其中式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式12】



(26) 如上述项目 (18) 记载的治疗和/或预防方法, 其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

(27) 如上述项目 (18) 记载的治疗和/或预防方法, 其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

(28) 如上述项目 (18) 记载的治疗和/或预防方法, 其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

(29) 如上述项目 (18) 记载的治疗和/或预防方法, 其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。

(30) 如上述项目 (18) 记载的治疗和/或预防方法, 其中前述脂肪性肝病为由NASH

引起的肝细胞癌(HCC)。

(31) 如上述项目(18)记载的治疗和/或预防方法,其中不会因式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血浆甘油三酯上升的副作用。

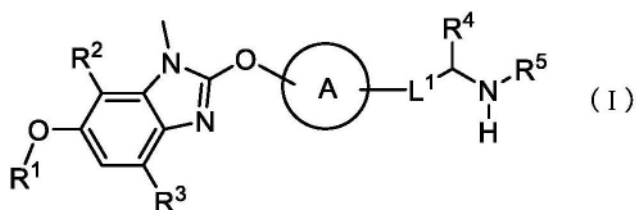
(32) 如上述项目(18)记载的治疗和/或预防方法,其中不会因式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随心血管病的副作用。

(33) 如上述项目(18)记载的治疗和/或预防方法,其中通过式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用,可改善胰岛素抵抗。

(34) 如上述项目(18)记载的治疗和/或预防方法,其中不会因式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血小板浓度降低的副作用。

(35) 一种式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的用途,其用于制造脂肪性肝病的治疗和/或预防用药物,其中该式(I)如下:

【化学式13】



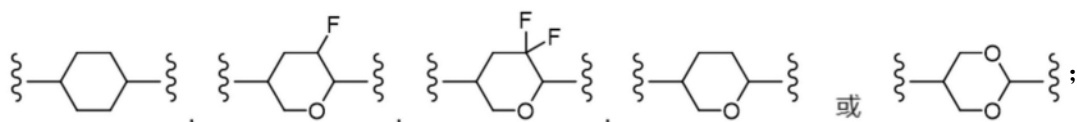
(式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

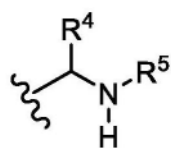
环A为下式所示的基:

【化学式14】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中,左侧的键与环A键合,右侧的键与式:

【化学式15】



所示的基键合。);

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(36) 如上述项目(35)记载的用途,其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

(37) 如上述项目(35)或(36)记载的用途,其中 R^2 为氢原子。

(38) 如上述项目(35)至(37)中任一项记载的用途,其中环A为下式所示的基:

【化学式16】



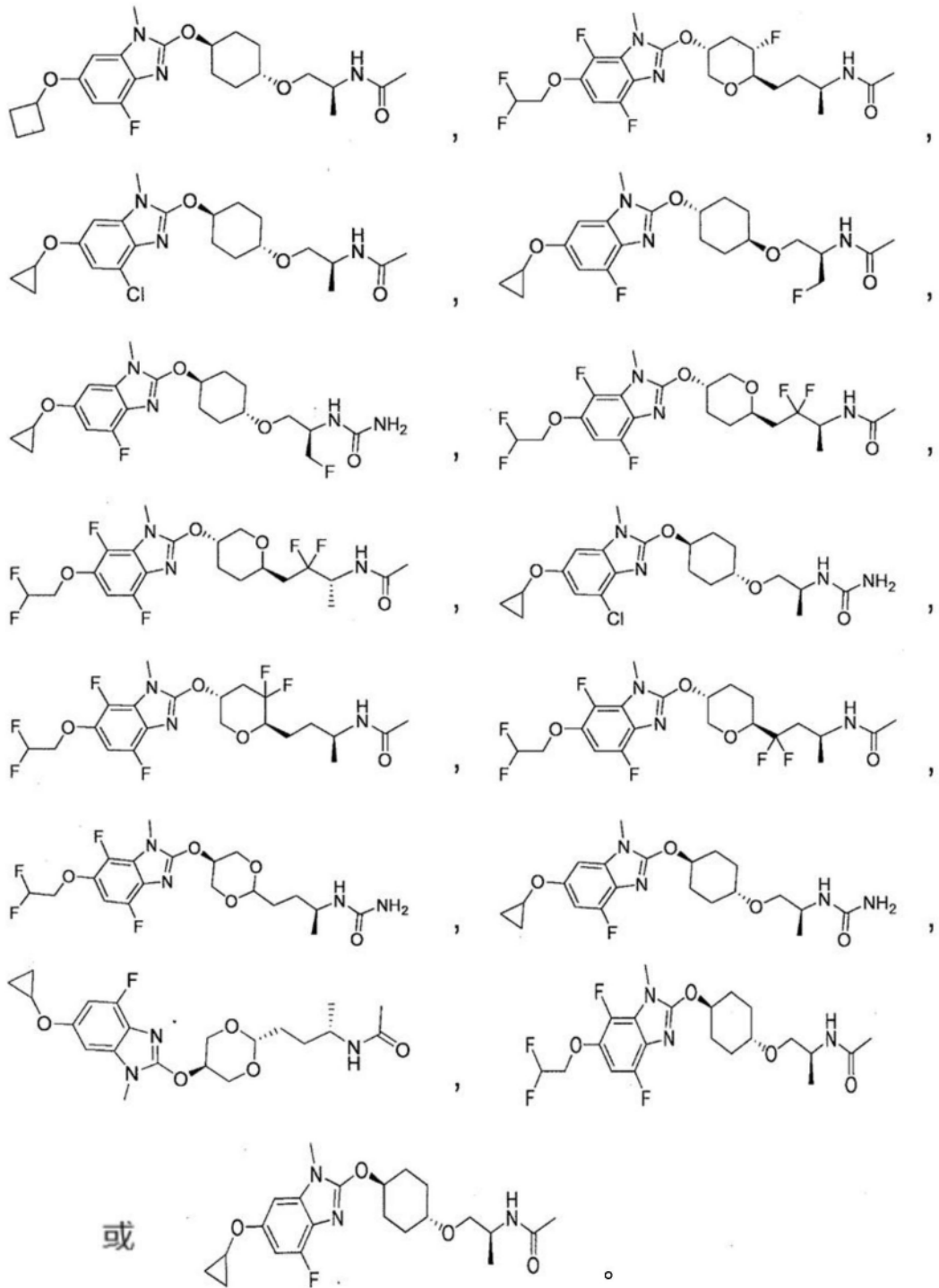
(39) 如上述项目 (35) 至 (38) 中任一项记载的用途, 其中 $-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

(40) 如上述项目 (35) 至 (39) 中任一项记载的用途, 其中 R^4 为烷基。

(41) 如上述项目 (35) 至 (40) 中任一项记载的用途, 其中 R^5 为甲基羰基或氨基甲酰基。

(42) 如上述项目 (35) 记载的用途, 其中式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式17】



(43) 如上述项目 (35) 记载的用途, 其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

(44) 如上述项目 (35) 记载的用途, 其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

(45) 如上述项目 (35) 记载的用途, 其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

(46) 如上述项目 (35) 记载的用途, 其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。

(47) 如上述项目 (35) 记载的用途, 其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌

(HCC)。

(48) 如上述项目 (35) 记载的用途,其中不会因式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血浆甘油三酯上升的副作用。

(49) 如上述项目 (35) 记载的用途,其中不会因式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随心血管病的副作用。

(50) 如上述项目 (35) 记载的用途,其中通过式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用,可改善胰岛素抵抗。

(51) 如上述项目 (35) 记载的用途,其中不会因式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用而伴随血小板浓度降低的副作用。

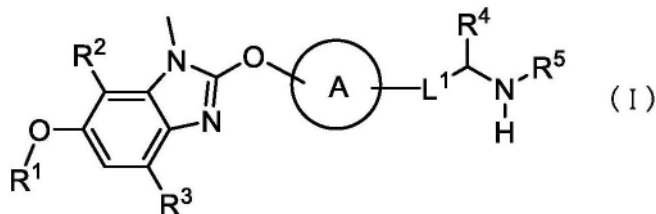
(52) 一种药物组合物,其含有:

式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐;及

选自奥贝胆酸 (obeticholic acid)、索马鲁肽 (semaglutide)、及瑞司美替罗 (resmetirom) 所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐;

其中该式 (I) 如下:

【化学式18】



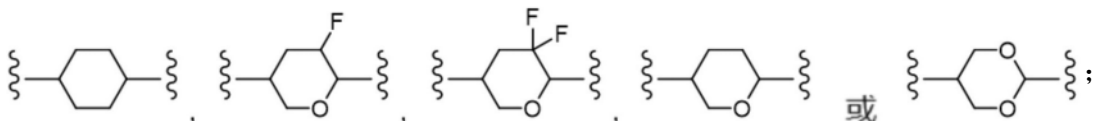
(式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

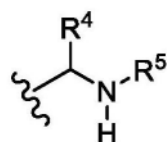
环A为下式所示的基:

【化学式19】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中,左侧的键与环A键合,右侧的键与式:

【化学式20】



所示的基键合。);

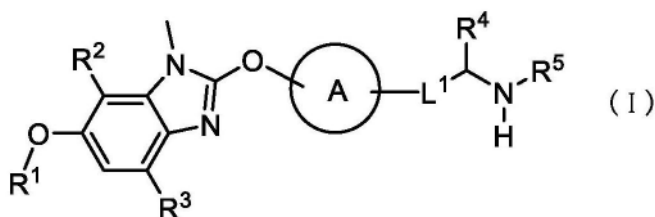
R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(53) 一种药物组合物,其含有用于与式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐并用而施用的药物,该药物为选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少

一种化合物,其中该式 (I) 如下:

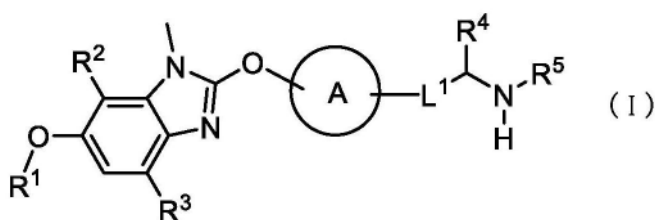
【化学式21】



(式中,各记号具有与上述项目 (52) 中者相同的意义。)

(54) 一种药物组合物,其含有用于与选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐并用而施用的药物,该药物为式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式22】



(式中,各记号具有与上述项目 (52) 中者相同的意义。)

(55) 如上述项目 (52) 至 (54) 中任一项记载的药物组合物,其中R¹为非芳香族碳环式基。

(56) 如上述项目 (52) 至 (55) 中任一项记载的药物组合物,其中R²为氢原子。

(57) 如上述项目 (52) 至 (56) 中任一项记载的药物组合物,其中环A为下式所示的基:

【化学式23】



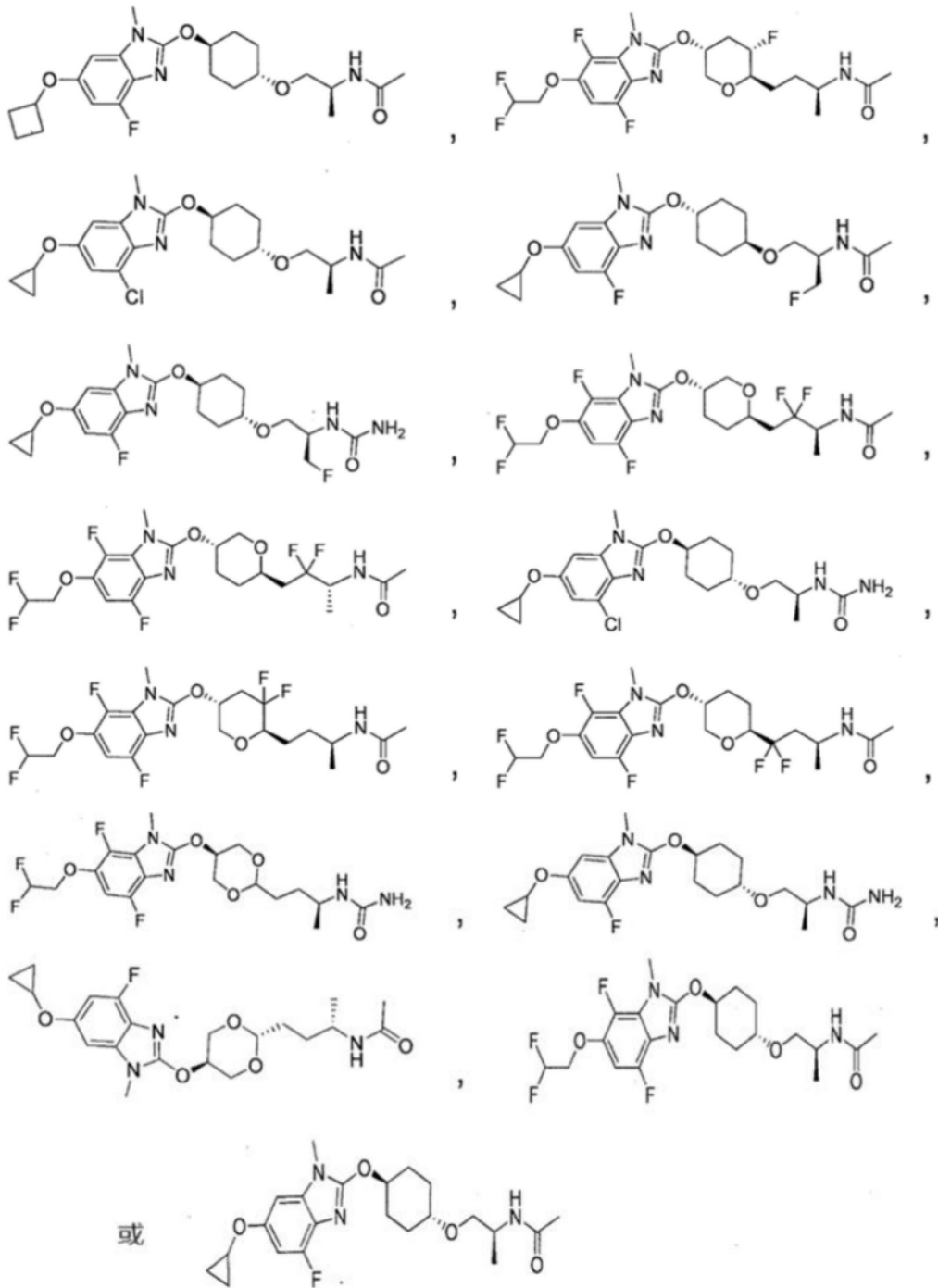
(58) 如上述项目 (52) 至 (57) 中任一项记载的药物组合物,其中-L¹-为-O-(CH₂)-或-(CH₂)₂-。

(59) 如上述项目 (52) 至 (58) 中任一项记载的药物组合物,其中R⁴为烷基。

(60) 如上述项目 (52) 至 (59) 中任一项记载的药物组合物,其中R⁵为甲基羰基或氨甲酰基。

(61) 如上述项目 (52) 至 (54) 中任一项记载的药物组合物,其中式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式24】



(62) 如上述项目 (52) 至 (54) 中任一项记载的药物组合物,其用于治疗 and/或预防脂肪性肝病。

(63) 如上述项目 (62) 记载的药物组合物,其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

(64) 如上述项目 (62) 记载的药物组合物,其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

(65) 如上述项目 (62) 记载的药物组合物,其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

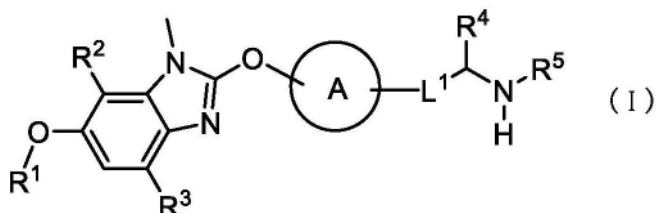
(66) 如上述项目 (62) 记载的药物组合物,其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝

硬化。

(67) 如上述项目 (62) 记载的药物组合物, 其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌(HCC)。

(68) 一种脂肪性肝病的治疗和/或预防方法, 其为将式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐; 及选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐组合而施用, 其中该式 (I) 如下:

【化学式25】



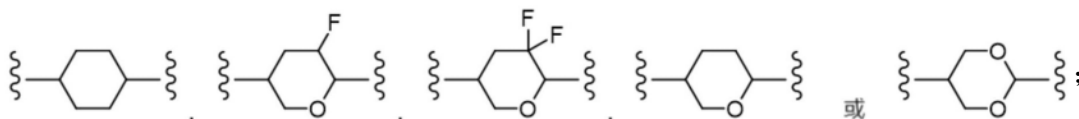
(式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

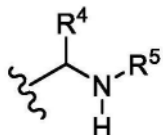
环A为下式所示的基:

【化学式26】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式27】



所示的基键合。);

R^4 为烷基或卤烷基;

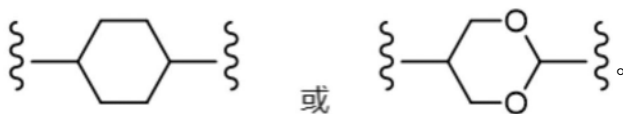
R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(69) 如上述项目 (68) 记载的治疗和/或预防方法, 其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

(70) 如上述项目 (68) 或 (69) 记载的治疗和/或预防方法, 其中 R^2 为氢原子。

(71) 如上述项目 (68) 至 (70) 中任一项记载的治疗和/或预防方法, 其中环A为下式所示的基:

【化学式28】



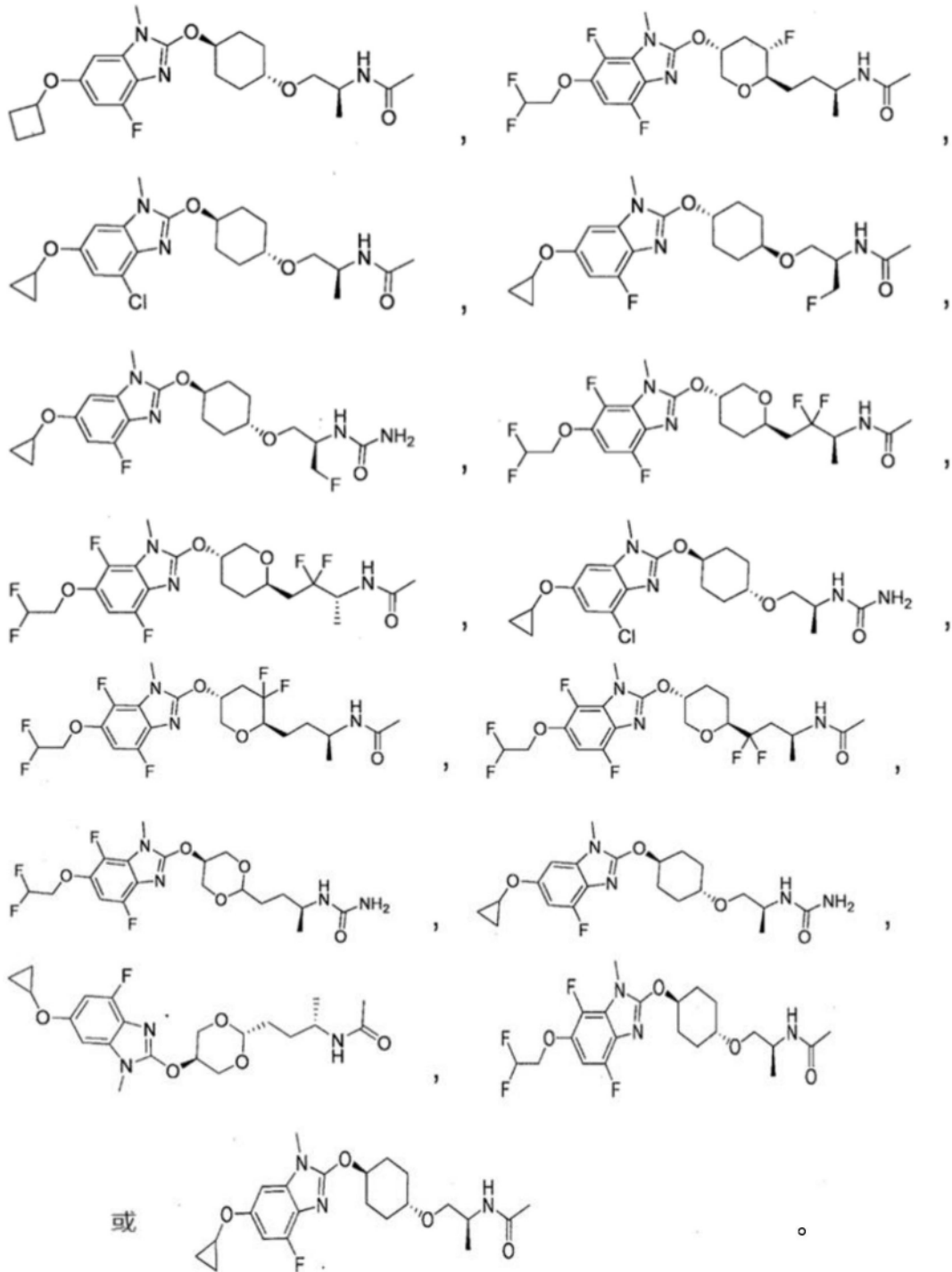
(72) 如上述项目 (68) 至 (71) 中任一项记载的治疗和/或预防方法, 其中 $-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

(73) 如上述项目 (68) 至 (72) 中任一项记载的治疗和/或预防方法,其中R⁴为烷基。

(74) 如上述项目 (68) 至 (73) 中任一项记载的治疗和/或预防方法,其中R⁵为甲基羰基或氨甲酰基。

(75) 如上述项目 (68) 记载的治疗和/或预防方法,其中式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式29】



(76) 如上述项目 (68) 记载的治疗和/或预防方法,其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

(77) 如上述项目 (68) 记载的治疗和/或预防方法,其中前述脂肪性肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

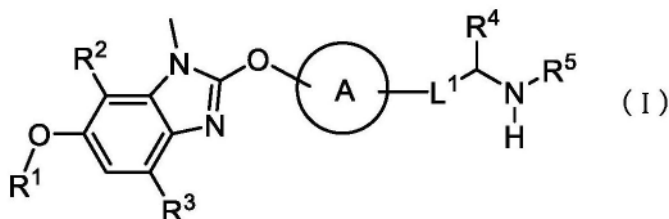
(78) 如上述项目 (68) 记载的治疗和/或预防方法,其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝纤维化。

(79) 如上述项目 (68) 记载的治疗和/或预防方法,其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝硬化。

(80) 如上述项目 (68) 记载的治疗和/或预防方法,其中前述脂肪性肝病为由NASH引起的肝细胞癌 (HCC)。

(1A) 一种用于治疗或预防非酒精性脂肪肝病的药物组合物,其含有式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐,其中该式 (I) 如下:

【化学式30】



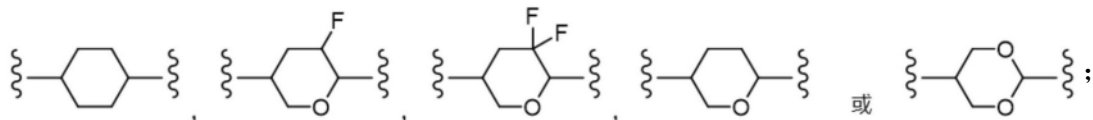
(式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

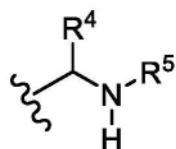
环A为下式所示的基:

【化学式31】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中,左侧的键与环A键合,右侧的键与式:

【化学式32】



所示的基键合。);

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(2A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物,其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

(3A) 如上述项目 (1A) 或 (2A) 记载的药物组合物,其中 R^2 为氢原子。

(4A) 如上述项目 (1A) 至 (3A) 中任一项记载的药物组合物,其中环A为下式所示的基:

【化学式33】



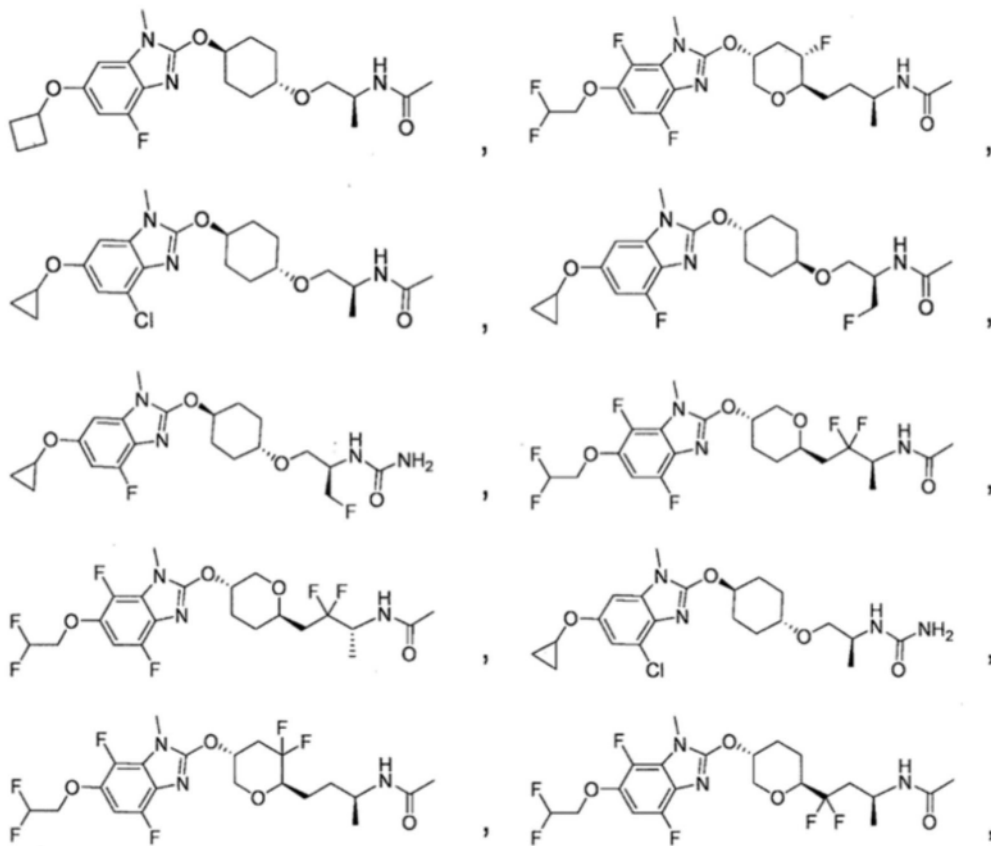
(5A) 如上述项目 (1A) 至 (4A) 中任一项记载的药物组合物, 其中 $-L^1-$ 为 $-O-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

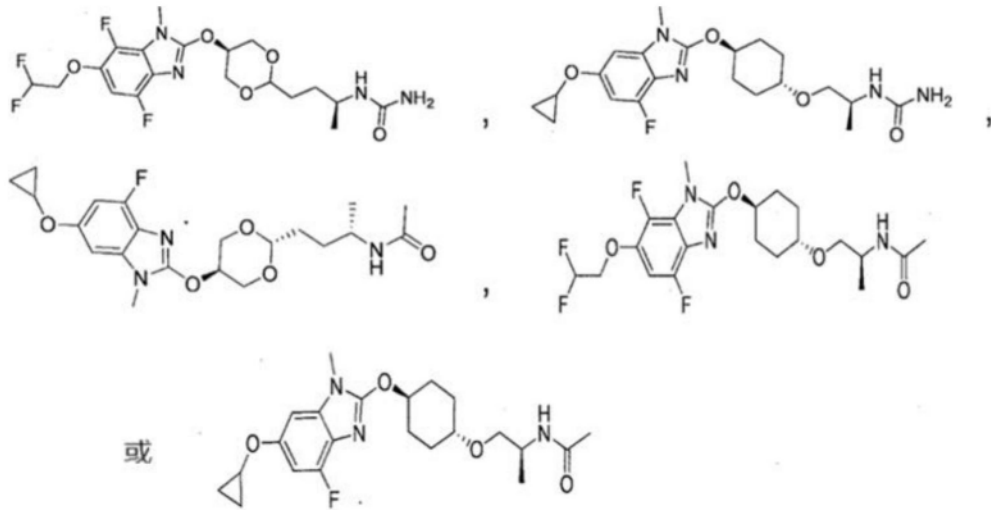
(6A) 如上述项目 (1A) 至 (5A) 中任一项记载的药物组合物, 其中 R^4 为烷基。

(7A) 如上述项目 (1A) 至 (6A) 中任一项记载的药物组合物, 其中 R^5 为甲基羰基或氨甲酰基。

(8A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式34】





(9A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

(10A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝纤维化。

(11A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝硬化。

(12A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝细胞癌 (HCC)。

(13A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中不会因前述药物组合物的施用而随血浆甘油三酯上升的副作用。

(14A) 如上述项目 (13A) 记载的药物组合物, 其中不会因前述药物组合物的施用而伴随心血管病的副作用。

(15A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中通过前述药物组合物的施用, 可改善胰岛素抵抗。

(16A) 如上述项目 (1A) 记载的药物组合物, 其中不会因前述药物组合物的施用而伴随血小板浓度降低的副作用。

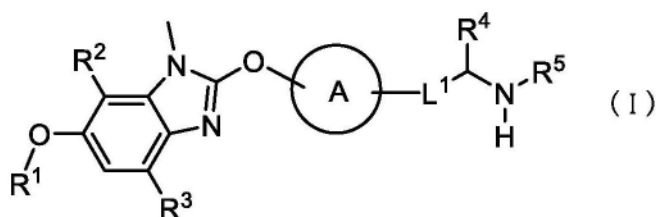
(17A) 一种药物组合物, 其含有:

式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐, 及

选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐,

其中式 (I) 如下:

【化学式 35】



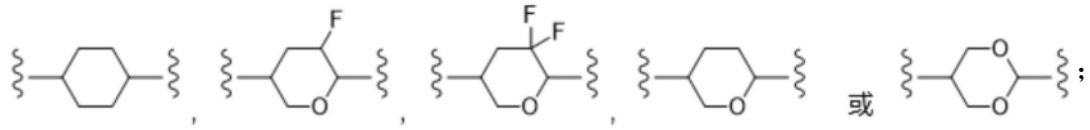
(式中, R¹ 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素；

R^3 为卤素；

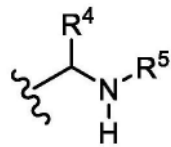
环A为下式所示的基：

【化学式36】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中,左侧的键与环A键合,右侧的键与式:

【化学式37】



所示的基键合。);

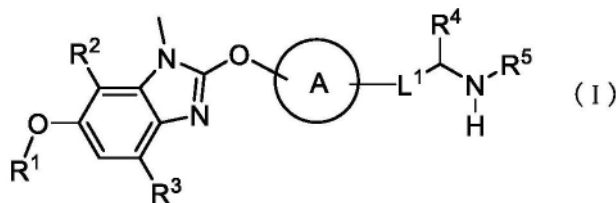
R^4 为烷基或卤烷基；

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(18A) 一种药物组合物,其含有用于与式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐并用而施用的药物,该药物为选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐；

其中该式 (I) 如下：

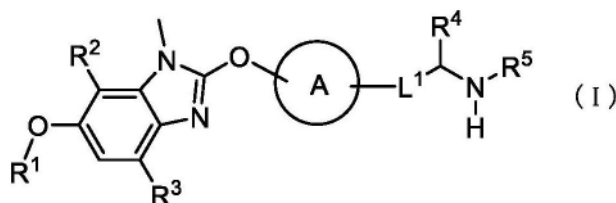
【化学式38】



(式中,各记号具有与上述项目 (17A) 中者相同的意义。)

(19A) 一种药物组合物,其含有用于与选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐并用而施用的药物,该药物为式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐：

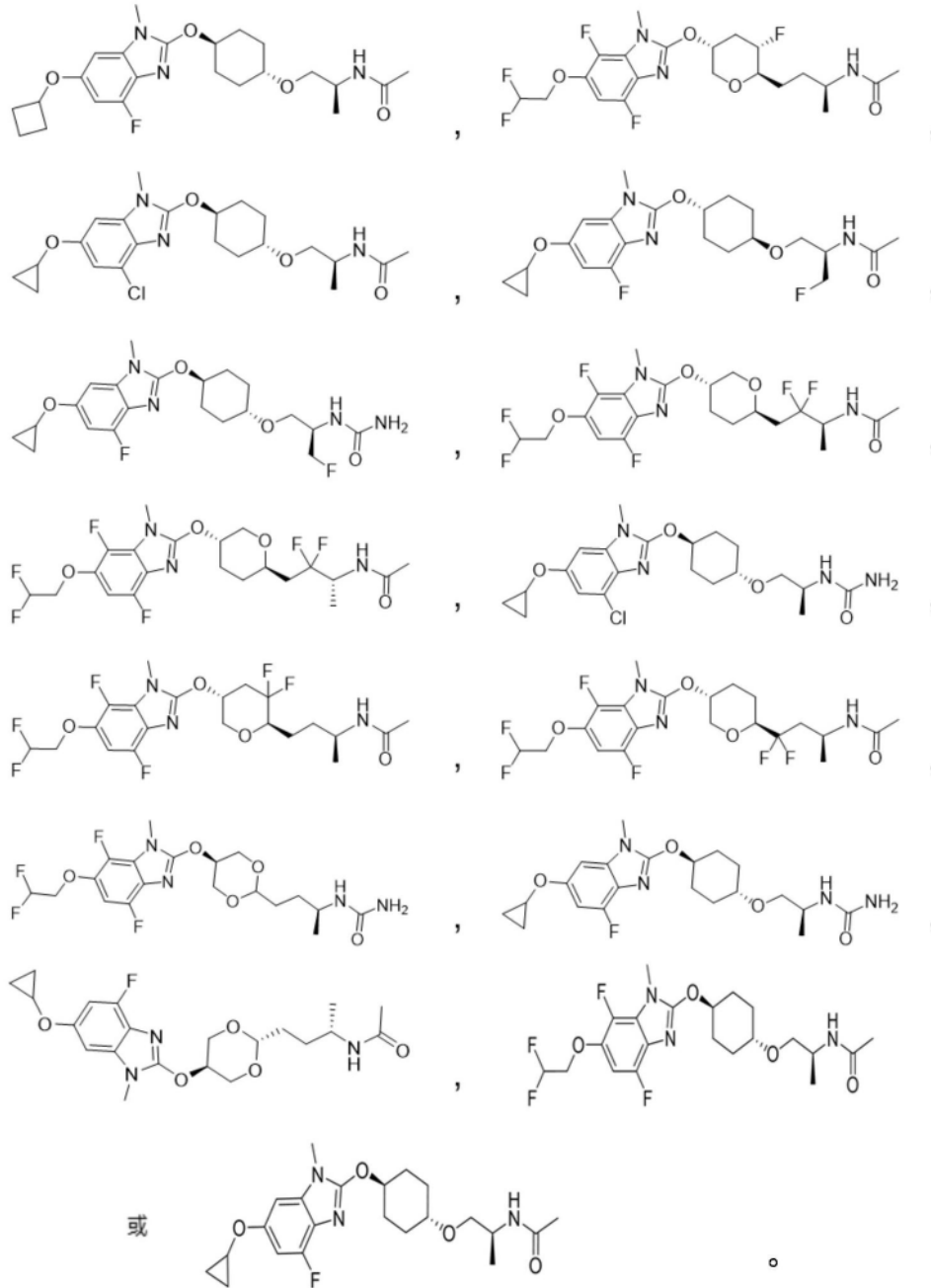
【化学式39】



(式中,各记号具有与上述项目 (17A) 中者相同的意义。)

(20A) 如上述项目 (17A) 至 (19A) 中任一项记载的药物组合物,其中式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐：

【化学式40】



(21A) 如上述项目 (17A) 至 (20A) 中任一项记载的药物组合物, 其用于治疗或预防非酒精性脂肪肝病。

(22A) 如上述项目 (21A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

(23A) 如上述项目 (21A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝纤维化。

(24A) 如上述项目 (21A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝硬化。

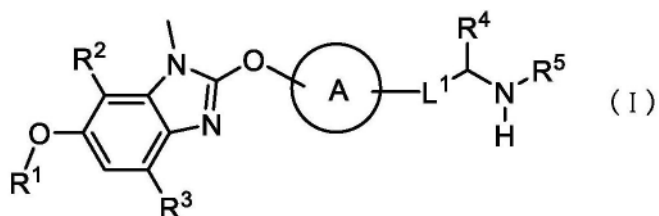
(25A) 如上述项目 (21A) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝细胞癌 (HCC)。

(26A) 一种非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防方法,其为将式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐;及

选自奥贝胆酸、索马鲁肽、及瑞司美替罗所构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐组合而施用,

其中该式(I)如下:

【化学式41】

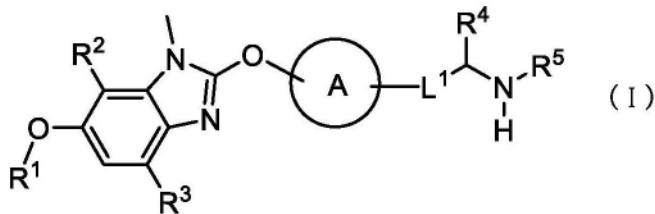


(式中,各记号具有与上述项目(17A)中者相同的意义。)

(27A) 如上述项目(26A)记载的治疗和/或预防方法,其中式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式42】

【化学式43】



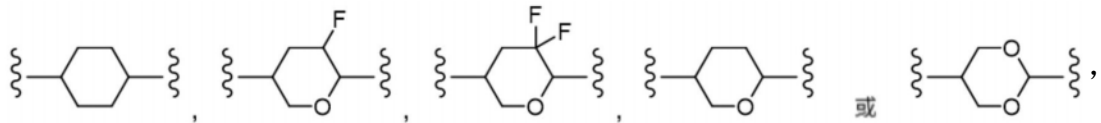
(式中, R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基;

R^2 为氢原子或卤素;

R^3 为卤素;

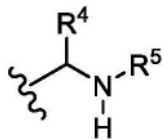
环A为下式所示的基:

【化学式44】



$-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式45】



所示的基键合。);

R^4 为烷基或卤烷基;

R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。)

(2B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中 R^1 为非芳香族碳环式基。

(3B) 如上述项目 (1B) 或 (2B) 记载的药物组合物, 其中 R^2 为氢原子。

(4B) 如上述项目 (1B) 至 (3B) 中任一项记载的药物组合物, 其中环A为下式所示的基:

【化学式46】



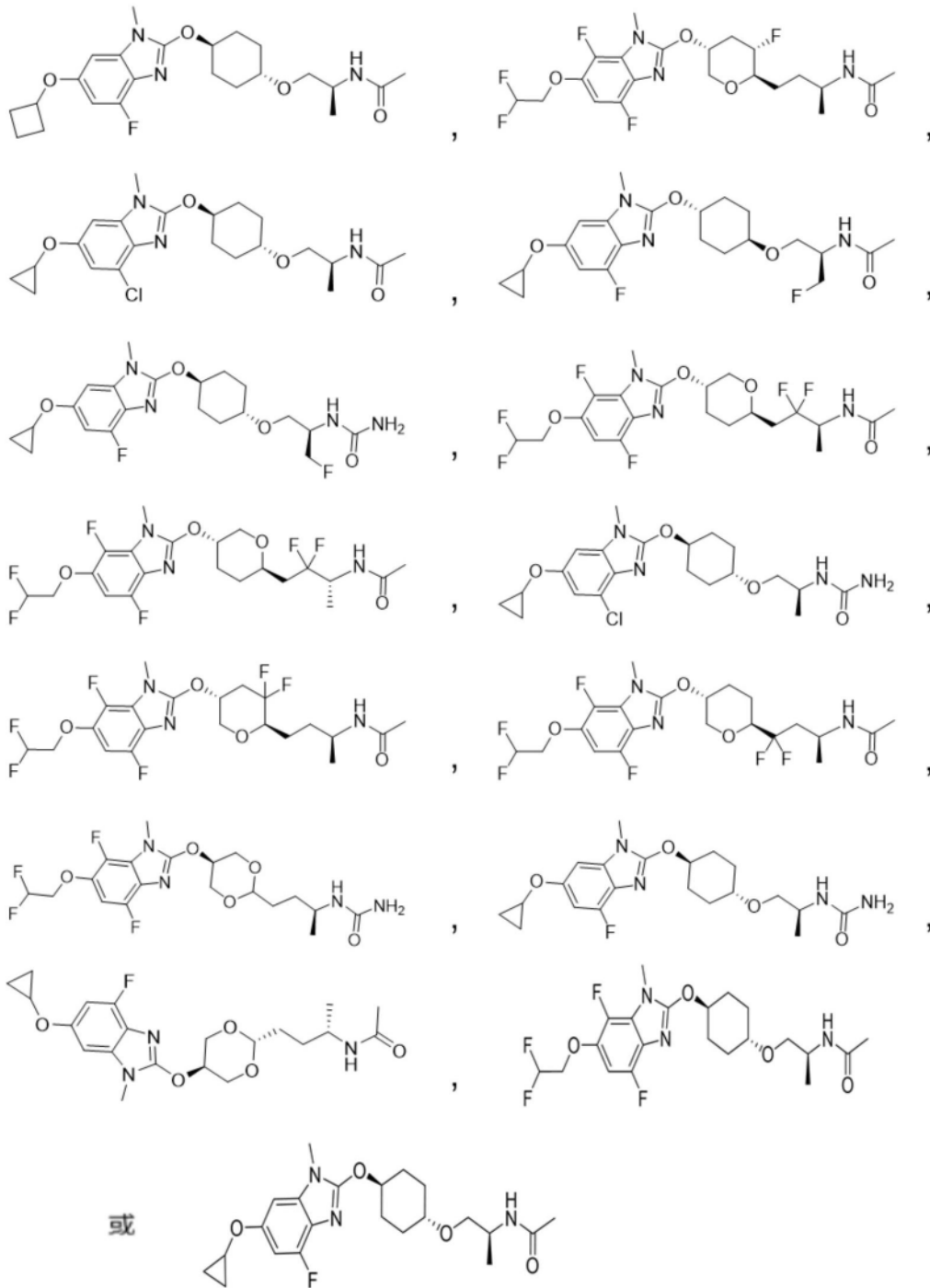
(5B) 如上述项目 (1B) 至 (4B) 中任一项记载的药物组合物, 其中 $-L^1-$ 为 $-O-$ 、 $-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

(6B) 如上述项目 (1B) 至 (5B) 中任一项记载的药物组合物, 其中 R^4 为烷基。

(7B) 如上述项目 (1B) 至 (6B) 中任一项记载的药物组合物, 其中 R^5 为甲基羰基或氨甲酰基。

(8B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐为选自下式所构成的组中的化合物或其药学上可接受的盐:

【化学式47】



(9B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

(10B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝纤维化。

(11B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝硬化。

(12B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中前述非酒精性脂肪肝病为由 NASH 引起的肝细胞癌 (HCC)。

(13B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中不会因前述药物组合物的施用而

伴随血浆甘油三酯上升的副作用。

(14B) 如上述项目 (13B) 记载的药物组合物, 其中不会因前述药物组合物的施用而伴随心血管病的副作用。

(15B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中通过前述药物组合物的施用, 可改善胰岛素抵抗。

(16B) 如上述项目 (1B) 记载的药物组合物, 其中不会因前述药物组合物的施用而伴随血小板浓度降低的副作用。

发明的效果

[0012] 本发明的含有式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物, 达到“在脂肪性肝病、尤其非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防上有效”的优良效果。又, 不会伴随血浆甘油三酯上升或血小板浓度的降低等副作用, 具有高安全性。再者, 本发明的式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐, 通过与对非酒精性脂肪肝病显示有效性且作用机制不同的其他药物组合物 (例如, 奥贝胆酸等) 组合, 达到比分别单独使用时更优选的优良效果。

附图说明

[0013] 图1展示在将化合物I-12施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的天狼星红 (Sirius Red) 阳性面积率。

图2展示在将化合物I-13施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的天狼星红 (Sirius Red) 阳性面积率。

图3展示在将化合物I-12施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的肝脏甘油三酯量。

图4展示在将化合物I-13施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的肝脏甘油三酯量。

图5展示在将化合物I-12施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的血浆3-羟基酪酸浓度。

图6展示在将化合物I-13施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的血浆3-羟基酪酸浓度。

图7展示在将化合物I-12施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的血浆甘油三酯浓度。

图8展示在将化合物I-13施用至超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠时的血浆甘油三酯浓度。

图9展示在将化合物I-12施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的天狼星红阳性面积率。

图10展示在将化合物I-13施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的天狼星红阳性面积率。

图11展示在将化合物I-12施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的肝脏甘油三酯量。

图12展示在将化合物I-13施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的甘油三酯量。

图13展示在将化合物I-12施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的血浆3-羟基酪酸浓度。

图14展示在将化合物I-13施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的血浆3-羟基酪酸浓度。

图15展示在将化合物I-12施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的血浆甘油三酯浓度。

图16展示在将化合物I-13施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的血浆甘油三酯浓度。

图17展示在将化合物I-13施用至高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠时的血红蛋白A1c浓度。

具体实施方式

[0014] 以下,说明本说明书中所用的各术语的意义。各术语只要无特别声明,在单独地使用情况,或与其他术语组合而使用的情况,均以相同的意义使用。

术语“构成”,意指只具有构成要件。

术语“包含”,意指不限定构成要件,未排除未记载的要素。

以下,关于本发明,展示实施方案并加以说明。在整个说明书中,只要未特别述及,单数形的表达应被理解成亦包含其复数形的概念。因此,单数形的冠词(例如,英语的情况的“a”、“an”、“the”等),只要未特别述及,应被理解成亦包含其复数形的概念。

又,在本说明书中所使用的术语,只要未特别述及,亦应被理解成以上述领域通常所用的意义使用。因此,只要无其他定义,本说明书中所使用的全部专门术语及科学技术术语,具有与本发明所属的领域的技术领域人士一般可理解者相同的意义。在有矛盾的情况,以本说明书(包含定义)为优先。

[0015] “卤素”包含氟原子、氯原子、溴原子、及碘原子。尤其以氟原子及氯原子为优选。

[0016] “烷基”包含碳数1至15,优选为碳数1至10,更优选为碳数1至6,进一步优选为碳数1至4的直链或分枝状的烃基。例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、二级丁基、三级丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基、正庚基、异庚基、正辛基、异辛基、正壬基、正癸基等。

就“烷基”的优选方案而言,可列举甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、二级丁基、三级丁基、正戊基。就更优选方案而言,可列举甲基、乙基、正丙基、异丙基、三级丁基。就特别优选方案而言,可列举甲基。

[0017] “卤烷基”意指上述“烷基”的1个以上的任何氢原子经上述“卤素”取代的基。例如,可列举单氟甲基、单氟乙基、单氟丙基、2,2-二氟乙基、2,2,3,3,3-五氟丙基、单氯甲基、三氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、2,2,2-三氯乙基、1,2-二溴乙基、1,1,1-三氟丙-2-基等。

[0018] “烷基羰基”意指上述“烷基”与羰基键合的基。例如,可列举甲基羰基、乙基羰基、丙基羰基、异丙基羰基、三级丁基羰基、异丁基羰基、二级丁基羰基、戊基羰基、异戊基羰基、己基羰基等。就“烷基羰基”的优选方案而言,可列举甲基羰基、乙基羰基、正丙基羰基等。就更优选方案而言,可列举甲基羰基。

[0019] “芳香族碳环式基”意指单环或2环以上的环状芳香族烃基。例如,可列举苯基、萘基、蒽基、菲基等。

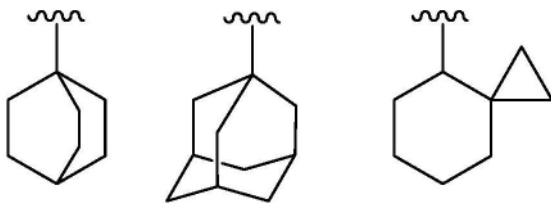
就“芳香族碳环式基”的优选方案而言,可列举苯基。

[0020] “芳香族碳环”意指从上述“芳香族碳环式基”衍生的环。

[0021] “非芳香族碳环式基”意指单环或2环以上的环状饱和烃基或环状非芳香族不饱和烃基。2环以上的“非芳香族碳环式基”,亦包含将上述“芳香族碳环式基”中的环稠合在单环或2环以上的非芳香族碳环式基者。

再者,“非芳香族碳环式基”亦包含如以下方式形成架桥的基、或螺环的基。

【化学式48】



就单环的非芳香族碳环式基而言,以碳数3至16为优选,更优选为碳数3至12,进一步优选为碳数3至6,特别优选为碳数3至4。例如,可列举环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基、环癸基、环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环己二烯基等。

就2环以上的非芳香族碳环式基而言,以碳数8至20为优选,更优选为碳数8至16。例如,可列举二氢茛基、茛基、茛基、茛基、四氢萘基、茛基等。

[0022] “非芳香族碳环”意指从上述“非芳香族碳环式基”衍生的环。

[0023] “芳香族杂环式基”意指环内具有1个以上任意选自O、S及N的相同或相异杂原子的单环或2环以上的芳香族环式基。

2环以上的芳香族杂环式基,亦包含在单环或2环以上的芳香族杂环式基上,与上述“芳香族碳环式基”的环稠合者,任何环均可具有键。

就单环的芳香族杂环式基而言,以5至8元为优选,更优选为5元或6元。就5元芳香族杂环式基而言,例如,可列举吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噻二唑基、异噻唑基、噻唑基、噻二唑基等。就6元芳香族杂环式基而言,例如,可列举吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基等。

就2环的芳香族杂环式基而言,以8至10元为优选,更优选为9元或10元。例如,可列举吲哚基、异吲哚基、吲唑基、吲哚啉基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、酞嗪基、喹啉基、茶啉基、喹啉基、嘌呤基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并异噻唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并异噻唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并三唑基、咪唑并吡啶基、三唑并吡啶基、咪唑并噻唑基、吡嗪并哒嗪基、噻唑并吡啶基、噻唑并吡啶基等。

就3环以上的芳香族杂环式基而言,以13至15元为优选。例如,可列举咪唑基、吲哚基、咕吨基、吩噻嗪基、吩噻嗪基、吩噻嗪基、二苯并呋喃基等。

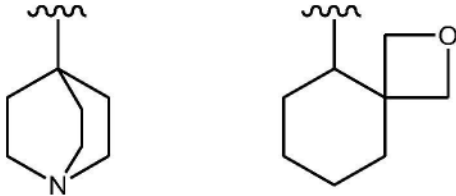
[0024] “芳香族杂环”意指从上述“芳香族杂环式基”衍生的环。

[0025] “非芳香族杂环式基”意指环内具有1个以上任意选自O、S及N的相同或相异杂原子

的单环或2环以上的非芳香族环式基。2环以上的非芳香族杂环式基,可在单环或2环以上的非芳香族杂环式基,与上述“芳香族碳环式基”、“非芳香族碳环式基”、和/或“芳香族杂环式基”中的各个环稠合者,再者,亦包含在单环或2环以上的非芳香族碳环式基,与上述“芳香族杂环式基”中的环稠合者,任何环均可具有该键。

再者,“非芳香族杂环式基”亦包含如以下方式架桥的基、或形成螺环的基。

【化学式49】



就单环的非芳香族杂环式基而言,以3至8元为优选,更优选为5元或6元。

就3元非芳香族杂环式基而言,例如,可列举硫环丙基、氧环丙基、氮丙啶基。就4元非芳香族杂环式基而言,例如,可列举氧杂环丁基、氮杂环丁基。就5元非芳香族杂环式基而言,例如,可列举氧硫杂环戊基、四氢噻唑基、吡咯烷基、吡咯啉基、咪唑啉基、咪唑啉基、吡唑啉基、吡唑啉基、四氢呋喃基、二氢噻唑基、四氢异噻唑基、二氧杂环戊基、二氧杂环戊烯基、硫杂环戊基等。就6元非芳香族杂环式基而言,例如,可列举二噁烷基、二噁环己基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、N-吗啉基、硫吗啉基、N-硫吗啉基、二氢吡啶基、四氢吡啶基、四氢吡喃基、二氢噁嗪基、四氢吡嗪基、六氢嘧啶基、二噁嗪基、硫代吡喃基、噻嗪基等。就7元非芳香族杂环式基而言,例如,可列举六氢氮杂卓基、四氢二氮杂卓基、氧杂环庚基。

就2环以上的非芳香族杂环式基而言,以8至20元为优选,更优选为8至10元。例如,可列举吡啶基、异吡啶基、色烷基、异色烷基等。

[0026] “非芳香族杂环”意指从上述“非芳香族杂环式基”衍生的环。

[0027] 脂肪性肝病为中性脂肪在肝脏内蓄积而引起肝损伤的病的总称。先前以酒精为原因者居多,然而最近无饮酒习惯而肥胖的人等增加。将无关此种明确的饮酒史,而在肝组织所见,类似酒精性肝损伤的肝脂肪沉积为特征的肝损伤,称为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)。

[0028] 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD),可通过组织诊断、或影像诊断发现脂肪肝为排除酒精性肝损伤等其他肝病的病态。NAFLD为通过肝细胞中脂肪的蓄积而赋予特征,经常与代谢综合征的一部分方案(例如,2型真性糖尿病、胰岛素抵抗、高脂血症、高血压)相关。由于食用富含碳水化合物及高脂肪的饮食的消费,此病的发病率变得越来越普遍。一部分NAFLD患者会发展成非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

[0029] 属于脂肪性肝病的亚型的NASH为比NAFLD更严重的病态。其以最后将导致大囊泡性脂肪肝 (macrovesicular steatosis)、肝细胞的肿胀变性 (balloon degeneration) 和/或肝脏的瘢痕化(亦即,纤维化)的炎症为特征。被诊断为NASH的患者,将进行至肝脏纤维化阶段及最终发展成肝硬化。目前对于末期肝硬化NASH患者的处置为肝移植。

[0030] 肝纤维化为在几乎所有类型的慢性肝病中发生的细胞外基质蛋白质(包含胶原)的过剩蓄积。进行性肝纤维化将导致肝硬化、肝衰竭及门脉高压,而经常需要肝移植。

[0031] 随着肝纤维化的进行,肝细胞的周围将被纤维化包围,而进展成肝硬化。若肝硬化进展,会出现浮肿、腹水、黄疸等症状,若并发食道胃静脉曲张等消化道的病变,有时亦会发生

吐血等。又,伴随肝纤维化进展,也容易发生肝癌。

[0032] 肝细胞癌在源自肝脏的癌中最为常见,通常发生于肝脏有重度瘢痕(肝硬化)的患者。据报导,进行性肝纤维化及肝硬化患者于5年内,发生肝癌的频率为5-30%。

[0033] 酒精性肝病(alcoholic liver disease;ALD)包含脂肪肝(alcoholic fatty liver;AFL)、酒精性肝炎(alcoholic steatohepatitis;ASH)、重症型酒精性肝炎(severe alcoholic hepatitis;SAH)、肝纤维化(alcoholic liver fibrosis)、肝硬化等广泛病。

根据本发明的化合物,由于具有优良ACC2选择性抑制作用,在作为ALD的治疗剂和/或预防剂上亦有用。

[0034] 下列展示式(I)所示的化合物中的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 L^1 及环A的优选方案。就式(I)所示的化合物而言,可列举下列所示的具体例的全部组合的方案。

[0035] R^1 为卤烷基或非芳香族碳环式基。

R^1 优选为非芳香族碳环式基。

R^1 更优选为单环的非芳香族碳环式基,特别优选为环丙基或环丁基。

就 R^1 的其他优选方案而言,优选可列举2,2-二氟乙基。

[0036] R^2 为氢原子或卤素。

R^2 优选为氢原子或氟原子。

R^2 更优选为氢原子。

[0037] R^3 为卤素。

R^3 优选为氟原子或氯原子。

R^3 更优选为氟原子。

[0038] R^4 为烷基或卤烷基。

R^4 优选为烷基。

R^4 更优选为甲基。

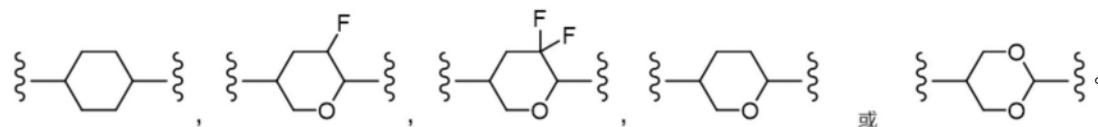
就 R^4 的其他优选方案而言,优选可列举单氟甲基。

[0039] R^5 为烷基羰基或氨甲酰基。

R^5 优选为甲基羰基或氨甲酰基。

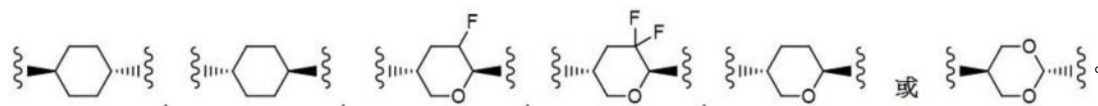
[0040] 环A为下式所示的基:

【化学式50】



环A优选为下式所示的基:

【化学式51】



环A更优选为下式所示的基:

【化学式52】



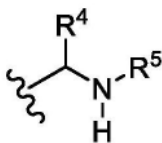
环A进一步优选为下式所示的基：

【化学式53】



[0041] $-L^1-$ 为 $-O-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)-(CF_2)-$ 或 $-(CF_2)-(CH_2)-$ (其中, 左侧的键与环A键合, 右侧的键与式:

【化学式54】

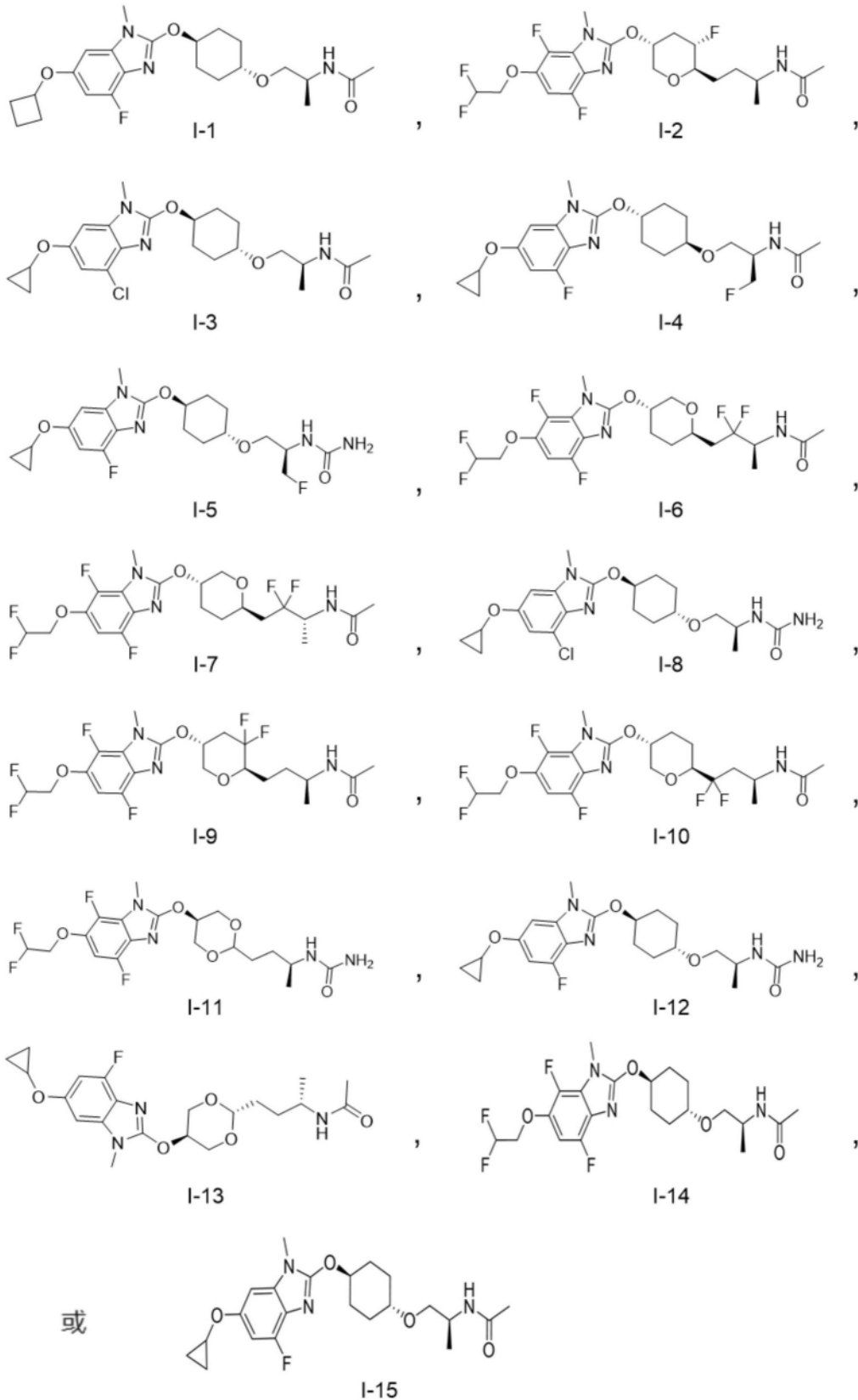


所示的基键合。)

$-L^1-$ 优选为 $-O-(CH_2)-$ 或 $-(CH_2)_2-$ 。

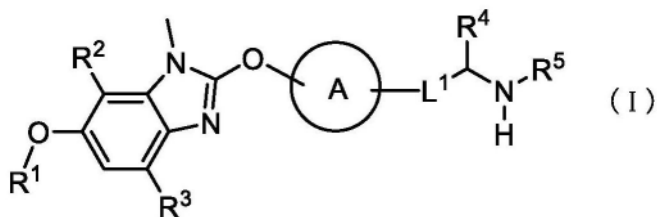
[0042] 就式(I)所示的化合物而言, 尤其以下列所示的化合物, 或其药学上可接受的盐为优选。

【化学式55】



[0043] 本发明的用于治疗 and/或预防非酒精性脂肪肝病的药物组合物,其特征为含有式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐,作为有效成分,其中该式(I)如下:

【化学式56】



(式中,各记号具有与前述者相同的意义)。

[0044] 本发明中所用的具有ACC2抑制作用的化合物为式(I)所示的化合物、其药学上可接受的盐、或那些的溶剂合物。

[0045] 式(I)所示的化合物,可依照公知的方法,例如,国际公开第2015/056782号及国际公开第2016/159082号记载的方法合成。

[0046] 式(I)所示的化合物,不限于特定的异构物,包含全部可能的异构物(例如,酮-烯醇异构物、亚胺-烯胺异构物、非镜像异构物、光学异构物、旋转异构物等)、消旋体或那些的混合物。

[0047] 式(I)所示的化合物的一个以上的氢、碳和/或其他原子,可分别被氢、碳和/或其他原子的同位素取代。就此种同位素的例而言,分别包含如²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁸O、¹⁷O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F、¹²³I及³⁶Cl的氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘及氯。式(I)所示的化合物,亦包含此种经同位素取代的化合物。该经同位素取代的化合物,在作为药物品上亦有用,包含式(I)所示的化合物的全部放射性标记物。又,用于制造该“放射性标记物”的“放射性标记方法”,亦包含于本发明,该“放射性标记物”,在作为代谢药物动态研究、结合测定的研究和/或诊断的工具上有用。

[0048] 式(I)所示的化合物的放射性标记物,可依照该技术领域中公知的方法制备。例如,式(I)所示的氙标记化合物,可通过使用氙的催化脱卤反应,在式(I)所示的特定化合物中导入氙而制备。此方法包含在适当的催化剂,例如Pd/C存在下,碱存在下或不存在下,使式(I)所示的化合物经适当卤素取代而得到的前体与氙气体反应。用于制备氙标记化合物的其他适当方法,可参照“物理及生医科学中的同位素(Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences), Vol.1, Labeled Compounds (Part A), Chapter 6 (1987年)”。¹⁴C-标记化合物可通过使用具有¹⁴C碳的原料而制备。

[0049] 就式(I)所示的化合物的药学上可接受的盐而言,例如,可列举式(I)所示的化合物,与碱金属(例如,锂、钠、钾等)、碱土金属(例如,钙、钡等)、镁、过渡金属(例如,锌、铁等)、氨、有机碱(例如,三甲基胺、三乙基胺、二环己基胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、葡甲胺、乙二胺、吡啶、甲基吡啶、喹啉等)及氨基酸所形成的盐,或与无机酸(例如,盐酸、硫酸、硝酸、碳酸、氢溴酸、磷酸、氢碘酸等)、及有机酸(例如,甲酸、乙酸、丙酸、三氟乙酸、柠檬酸、乳酸、酒石酸、草酸、马来酸、富马酸、琥珀酸、扁桃酸、戊二酸、苹果酸、苯甲酸、酞酸、抗坏血酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、乙磺酸、三氟乙酸等)所形成的盐。这些盐可依照通常进行的方法形成。

[0050] 本发明的式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐,在形成溶剂合物(例如,水合物等)、共晶体和/或晶体多形的情况,本发明亦包含其的各种溶剂合物、共晶体及晶体多形。“溶剂合物”可对式(I)所示的化合物,与任何数的溶剂分子(例如,水分子等)配位。通过将式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐放置于大气中,吸收水分,有附着吸附水的情

况,或形成水合物的情况。又,通过将式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐进行再晶体,有形成晶体多形的情况。“共晶体”意指式(I)所示的化合物或盐与相对分子(counter molecule)存在于同一晶格内,亦可包含任何数目的相对分子。

[0051] 本发明的式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐,有形成前药(protodrug)的情况,本发明亦包含其各种前药。前药为具有可化学或代谢分解的基团的本发明化合物的衍生物,其通过加溶剂分解,或于生理学条件下,在活体中形成具药学活性的本发明化合物的化合物。前药包含在体内的生理条件下,被酶氧化、还原、水解等,而变换为式(I)所示的化合物的化合物,或通过胃酸等水解,变换为式(I)所示的化合物的化合物等。选择适当之前药衍生物的方法及制造的方法,记载于例如“前药设计(Design of Prodrugs), Elsevier, Amsterdam, 1985”。前药有时本身具有活性。

[0052] 本发明的化合物由于具有优良的ACC2选择性抑制作用,所以在作为脂肪性肝病,尤其非酒精性脂肪肝病的治疗剂和/或预防剂上有用。非酒精性脂肪肝病不限于非酒精性脂肪肝炎(NASH),本发明的化合物在作为因NASH引起的肝纤维化、肝硬化或肝细胞癌(HCC)的治疗剂和/或预防剂上亦有用。

再者,本发明化合物具备作为药物的有用性,优选为具有下述的任一种,或复数种优良的特征。

a) 对CYP酶(例如,CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4等)的抑制作用弱。

b) 显示高生物利用度(bioavailability)、适度清除性(clearance)等良好的药物动态。

c) 代谢稳定性高。

d) 对于CYP酶(例如,CYP3A4),在本说明书记载的测定条件的浓度范围内,未呈现不可逆的抑制作用。

e) 不具有致突变性。

f) 心血管系统的风险低。

g) 显示高溶解性。

h) 不会伴随血浆甘油三酯上升的副作用。

i) 不会伴随心血管病的副作用。

j) 可改善胰岛素抵抗。

k) 不会伴随血小板浓度降低的副作用。

l) 通过将本发明化合物,与对非酒精性脂肪肝病显示有效性而作用机制不同的其他药物组合物(例如,奥贝胆酸(obeticholic acid)等)组合,可达到比个别单独使用时更优良的效果,再者,可减低该化合物的施用量。

[0053] 本发明的药物组合物可通过经口方式、非经口方式的任一种方法施用。就非经口施用的方法而言,可列举经皮、皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、腹腔内、经黏膜、吸入、经鼻、点眼、点耳、阴道内施用等。

[0054] 经口施用的情况,依照常法,只要制备成内用固体制剂(例如,片剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、丸剂、薄膜剂等)、内用液剂(例如,悬浮剂、乳剂、酞剂、糖浆剂、柠檬汁剂、酒精剂、芳香水剂、萃取剂、煎剂、酞剂等)等通常所用的任一种剂型而施用即可。片剂可为糖衣片、薄膜被覆片、肠溶性被覆片、缓释片、片片、舌下片、口腔片、可咀嚼片或口腔内崩散片,散剂

及颗粒剂可为干糖浆,胶囊剂可为软胶囊剂、微胶囊剂或缓释性胶囊剂。

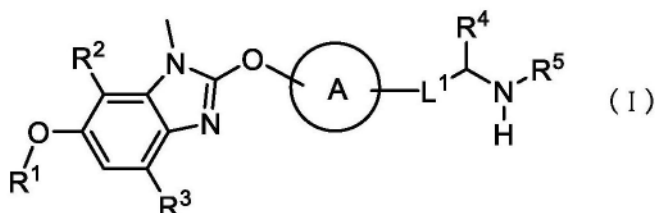
[0055] 在非经口施用的情况,适合以注射剂、点滴剂、外用剂(例如,点眼剂、点鼻剂、点耳剂、气溶胶剂、吸入剂、冲洗剂、注入剂、涂布剂、含嗽剂、浣肠剂、软膏剂、硬膏剂、果冻剂、乳膏剂、贴附剂、贴片剂、外用散剂、栓剂等)等通常所用的任一种剂型施用。注射剂可为O/W、W/O、O/W/O、W/O/W型等乳液。

[0056] 对本发明化合物的有效量,视需要与适合其剂型的赋形剂、黏合剂、崩散剂、润滑剂等各种药物用添加剂混合,可形成药物组合物。再者,该药物组合物亦可通过适当地变更本发明化合物的有效量、剂型和/或各种药物用添加剂,形成儿童用、老人用、重症患者用或手术用的药物组合物。例如,儿童用药物组合物,可施用至新生儿(出生后未满4周)、乳儿(出生后4周至小于1岁)、幼儿(1岁以上小于7岁)、儿童(7岁以上小于15岁)或15岁至18岁的患者。例如,老人用药物组合物可施用至65岁以上的患者。

[0057] 本发明的药物组合物的施用量,期望考虑患者的年龄、体重、疾病的种类或程度、施用途等而设定,然而在经口施用的情况,通常为0.05至100mg/kg/日,优选为0.1至10mg/kg/日的范围内。在非经口施用的情况,随着施用途而大不相同,然而通常为0.005至10mg/kg/日,优选为0.01至1mg/kg/日的范围内。只要将其分为1日1次至数次施用即可。

[0058] 本发明的式(I):

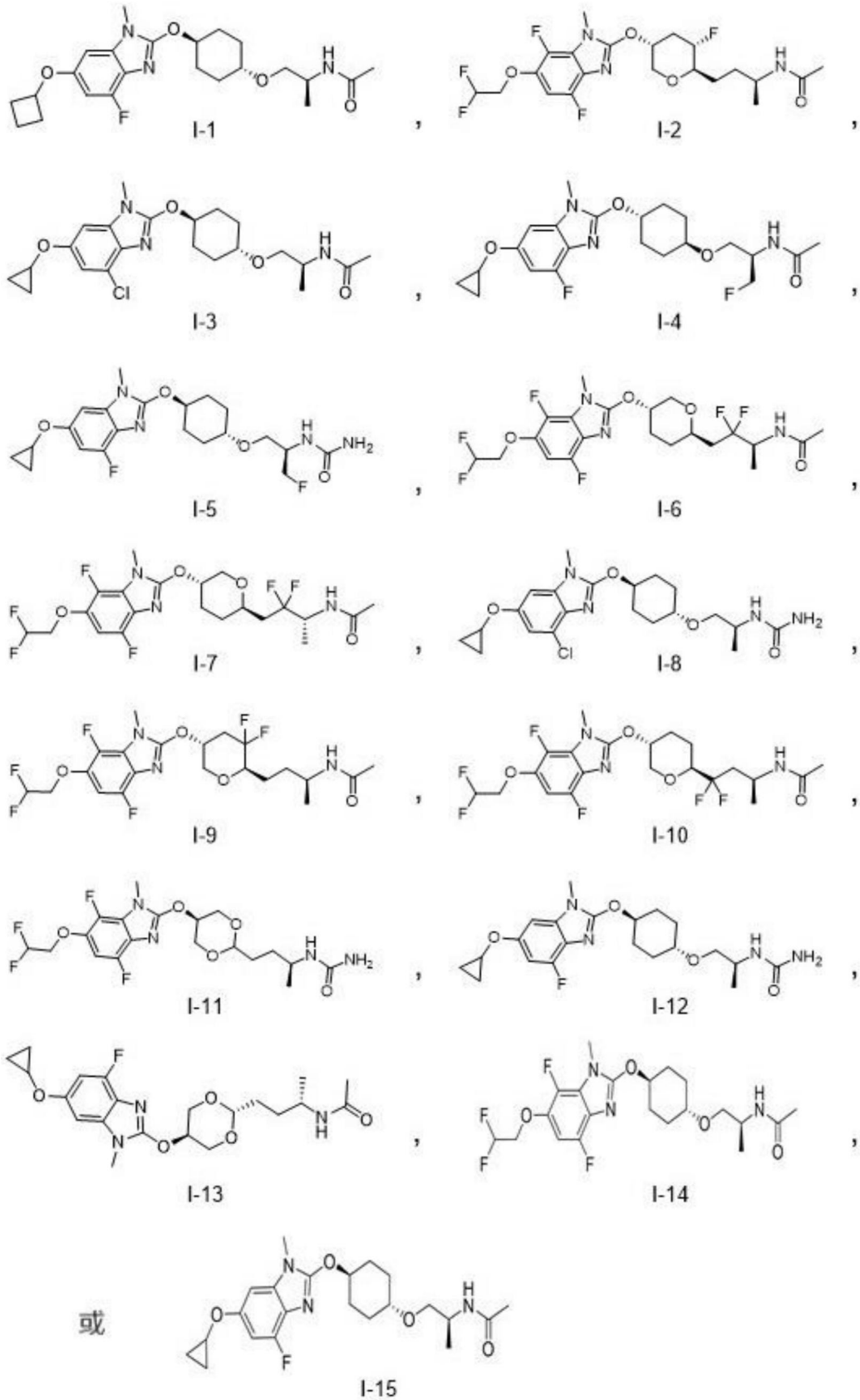
【化学式57】



(式中,各记号与前述者相同意义。)所示的化合物或其药学上可接受的盐,以该化合物的作用增强或该化合物的施用量减低等为目的,可与FXR激动剂、GLP1受体激动剂、TH β 受体激动剂、MGAT2抑制剂、DGAT抑制剂、PPAR激动剂、FGF21及、对FGF21施加修饰的药剂组合而使用。例如,可与选自奥贝胆酸、索马鲁肽(semaglutide)、及瑞司美替罗(resmetirom)构成的组中的至少一种化合物或其药学上可接受的盐(以下,称为并用药剂)组合而使用。此时,本发明化合物与并用药剂的施用时期并无限定,可将这些对施用对象,同时地或连续地施用,亦可安排时间差而施用。再者,本发明化合物与并用药剂,可作为包含各个活性成分的2种以上的制剂施用,亦可作为包含那些活性成分的单一制剂施用。

[0059] 就式(I)所示的化合物而言,尤其以下列所示的化合物、或其药学上可接受的盐为优选。

【化学式58】

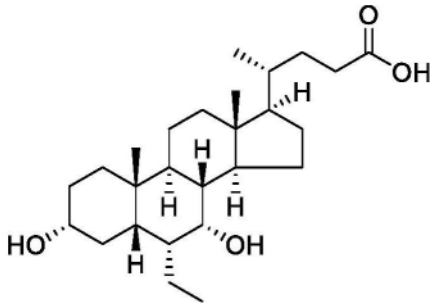


[0060] 并用药剂的施用量可依照临床上所用的用量作为基准,而适当地选择。又,本发明化合物与并用药剂的调配比,可依据施用对象、施用途径、对象疾病、症状、组合等而适当地选择。例如,在施用对象为人类的情况,相对于本发明化合物1重量份,使用0.01至100重量

份的并用药剂即可。

[0061] 奥贝胆酸为半合成胆汁酸为对核内受体FXR (farnesoid X receptor) 的激动剂。以下,展示奥贝胆酸的化学构造式。

【化学式59】

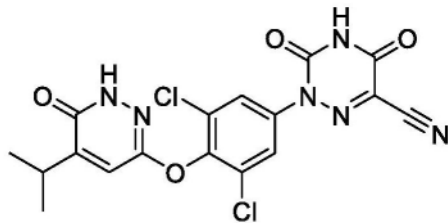


在欧美已经作为原发性胆汁性胆管炎治疗药上市。又,适用于非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 等非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的开发亦正在进行中。

[0062] 索马鲁肽为人类升糖素 (glucagon) 样肽-1 (GLP-1) 类似物,已推出作为2型糖尿病治疗药。又,正在开发适用于非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 的皮下注射剂。

[0063] 瑞司美替罗为具有甲状腺荷尔蒙受体 β (THR- β) 选择性激动剂作用的低分子化合物。以下,展示瑞司美替罗的化学构造式。

【化学式60】



在欧美,正为适用于非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 等而进行开发。

实施例

[0064] 以下列举实施例及试验例,进一步详细地说明本发明,然而本发明不受这些限定。

[0065] 制备例1:重组人类ACC2的制备

通过人类肾脏cDNA数据库 (Clontech公司) 克隆编码人类ACC2蛋白质 (从N末端27氨基酸残基至2458氨基酸残基) 的cDNA,于5'末端导入His-tag序列后,插入pFastBac1 (Invitrogen公司)。依照Bac-to-Bac杆状病毒表达系统 (Invitrogen公司) 的规程,制作重组杆状病毒后,使Sf-9细胞感染,表达人类ACC2蛋白质。将回收的细胞破碎,以过滤器过滤后,付诸于Ni亲和性色谱及阴离子交换色谱。回收包含人类ACC2蛋白质的部分,得到重组人类ACC2。

[0066] 制备例2:重组人类ACC1的制备

通过人类肝脏cDNA数据库 (BioChain公司) 克隆编码人类ACC1蛋白质 (从N末端1氨基酸残基至2346氨基酸残基) 的cDNA,在3'末端导入myc标签及His-tag序列后,插入pIEXBAC3 (Novagen公司) 中。依照FlashBACGOLD (Oxford Expression Technologies公司) 的规程,制作重组杆状病毒后,使Sf-9细胞感染,表达人类ACC1蛋白质。将回收的细胞破碎,以过滤器过滤后,付诸于Ni亲和性色谱及阴离子交换色谱。将包含人类ACC1蛋白质的部分

回收,得到重组人类ACC1。

[0067] 试验例1:人类ACC1及ACC2抑制活性的测定

将通过上述的制备例所得到的重组人类ACC1及重组人类ACC2,于检定缓冲液(50mM HEPES-KOH(pH 7.4)、10mM氯化镁、6至10mM柠檬酸钾、4mM还原型麸胱甘肽、1.5mg/ml牛血清白蛋白)中进行1小时预培育(pre-incubation)。继而,在分注0.2μL的各个本发明化合物溶液(DMSO)的384孔微培养盘中,添加预培育的酶溶液5μL及基质溶液(50mM HEPES-KOH(pH 7.4)、1mM ATP、0.8mM乙酰基CoA、25至50mM碳酸氢钾)5μL,离心、振动后,在湿润箱中,于室温培育1至3小时。培育后,通过EDTA的添加,停止酶反应,然后,于MALDI靶板(target plate)上,与CHCA(α-氰基-4-羟基桂皮酸)基质共晶体,使用基质支持激光脱离离子化-飞行时间型质量分析计(MALDI-TOF MS),以反射器负模式(reflector negative mode)进行测定。检测基质的乙酰基CoA(AcCoA)与属于反应产物的丙二酰基CoA(MalCoA)的脱质子化离子,使用各个信号强度,算出变成丙二酰基CoA或琥珀酰基CoA的变换率,即 $\text{Intensity of [MalCoA-H]}^- / (\text{Intensity of [MalCoA-H]}^- + \text{Intensity of [AcCoA-H]}^-)$ 。从于各化合物浓度的酶反应的抑制率算出50%抑制浓度(IC50值)。再者,检定缓冲液中的柠檬酸钾浓度、基质溶液中的碳酸氢钾浓度及培育时间,视所使用的每批酶,于上述的浓度或反应时间内进行调整。

[0068] 将试验例1的结果,展示于下。

[表1]

化合物编号	IC50 [μM]	
	hACC1	hACC2
I-1	0.32	0.0051
I-2	2.4	0.01
I-3	2.8	0.0066
I-4	2.7	0.0047
I-5	6.9	0.0089
I-6	0.92	0.012
I-7	25	0.18
I-8	6.2	0.017
I-9	2.6	0.013
I-10	>100	0.089
I-11	7	0.0096
I-12	6.9	0.0056
I-13	0.91	0.0066
I-14	2.7	0.0066
I-15	1.7	0.0038

[0069] 试验例2:代谢稳定性试验

使市售的汇集(pooled)人类肝微粒体与本发明化合物反应一定时间,通过反应样本与未反应样本的比较,算出残存率,评价本发明化合物于肝中代谢的程度。

[0070] 在包含人类肝微粒体 (0.5mg蛋白质/mL) 的0.2mL的缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl pH7.4、150mmol/L氯化钾、10mmol/L氯化镁) 中,于1mmol/L NADPH存在下,在37℃反应0或30分钟(氧化反应)。反应后,在甲醇/乙腈=1/1 (v/v) 溶液100μL中添加反应液50μL,并混合,以3000rpm离心15分钟。其离心上清液中的本发明化合物,通过LC/MS/MS或固相萃取 (SPE)/MS定量,以0分反应时的化合物量当作100%,计算反应后的本发明化合物的残存量。

[0071] 将试验例2的结果展示于下。

[表2]

化合物编号	化合物残存量 [%]	
	人类	大鼠
I-3	80.3	82.6
I-4	93.4	87.3
I-5	98.9	83.4
I-6	93.2	74
I-7	89.1	74.7
I-8	83.6	85.4
I-11	95.8	94.5
I-12	83.3	85.5
I-13	95.4	87
I-14	94.8	78
I-15	80.2	76.2

[0072] 试验例3:组织移行性试验

对于8周龄、雄性的Cr1:CD (SD) 大鼠,于其未绝食下,将本发明化合物以0.5mg/mL/kg的用量进行静脉内施用,施用30分钟后,在麻醉下,通过从腹部大动脉采集全部血,使其放血死亡。然后,摘出肝脏及肌肉,以蒸馏水制备25%的均质物。另一方面,所得到的血液进行离心处理,形成血浆。然后,在组织均质物样本中以1:1添加对照血浆,另在血浆样本中以1:1添加对照组织均质物,使用LC/MS/MS测定各个样本。以所得到的测定时的面积比 (组织/血浆),作为组织Kp值。化合物I-12在肝脏中为6.10,在肌肉中为1.29,化合物I-13在肝脏中为4.06,在肌肉中为0.918。因此,本发明化合物具有在活体中,分布于肝脏及肌肉的特性。

[0073] 试验例4:肝脏及肌肉中的丙二酰基CoA浓度评价试验

使8周龄、雄性的BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jc1小鼠进行4小时绝食后,将本发明化合物以0.3至6mg/5mL/kg的用量进行经口施用,施用2小时后,于麻醉下,通过从腹部大静脉采集全部血,使其放血死亡。然后,摘出肝脏及肌肉,以均质缓冲液 (蒸馏水:60%过氯酸:85%磷酸=43:5:2) 制备9%的均质物。以LC/MS/MS定量组织中的丙二酰基CoA浓度。化合物I-12及化合物I-13均使肝脏、肌肉的丙二酰基CoA浓度,以依存于化合物施用量的方式降低。

[表3]

化合物编号	施用量 [mg/kg]	以媒剂施用组的丙二酰基CoA浓度作为100%时的内脏中的丙二酰基CoA浓度[%]	
		肝脏	肌肉
I-12	媒剂施用	100	100
	0.67	92.8	70.8
	2	91.1	59.5
	6	84.0	56.4
I-13	媒剂施用	100	100
	0.3	90.9	72.8
	1	86.5	64.9
	3	79.9	58.4

[0074] 试验例5:对超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料给饵小鼠的肝纤维化进展的效果

对6周龄、雄性的C57BL/6Jc1小鼠以超高脂肪胆碱欠缺甲硫氨酸减量饲料(60kcal%脂肪含量,使用猪脂(lard),胆碱欠缺,甲硫氨酸减量(0.1%))给饵,同时将本发明化合物以成为3至45mg/kg/10mL的施用量的条件悬浮于媒剂(0.5%甲基纤维素水溶液),进行8周经口反复施用(b.i.d.)。在反复施用期间中从尾静脉进行采血,测定血浆中的生化学参数。施用8周后,于麻醉下进行腹部大静脉采血后,摘取肝脏。对从摘取的肝脏制成的石蜡包埋切片施行天狼星红染色。通过天狼星红阳性面积率求取肝脏中的纤维化进展的程度,并评价。

[0075] 在化合物I-12为30mg/kg的施用量中,天狼星红阳性面积率与媒剂施用组比较,是有意义的低值。将结果示于图1及表4。

[表4]

施用组	天狼星红阳性面积率(%)
媒剂	4.12±0.50
I-12(3mg/kg,bid)	3.47±0.41
I-12(10mg/kg,bid)	4.46±0.69
I-12(30mg/kg,bid)	2.29±0.32*

数据:平均值±标准误差

*:相对于媒剂施用组 $p < 0.05$ (Dunnett检定)

化合物I-13在45mg/kg的施用量中,天狼星红阳性面积率与媒剂施用组比较,是有意义的低值。将结果示于图2及表5。

[表5]

施用组	天狼星红阳性面积率(%)
媒剂	1.68±0.21
I-13(15mg/kg,bid)	1.33±0.20
I-13(45mg/kg,bid)	1.06±0.10*

数据:平均值±标准误差

*: 相对于媒剂施用组 $p < 0.05$ (Dunnett 检定)

化合物I-12为10、30mg/kg的施用量, 化合物I-13为45mg/kg的施用量, 肝脏中的甘油三酯量与媒剂施用组比较, 是有意义的低值。将结果示于图3、4及表6、7。

[表6]

施用组	肝脏甘油三酯量 (mg/g组织)
媒剂	172 ± 8.9
I-12 (3mg/kg, bid)	157 ± 7.3
I-12 (10mg/kg, bid)	137 ± 7.2*
I-12 (30mg/kg, bid)	144 ± 7.5*

数据: 平均值 ± 标准误差

*: 相对于媒剂施用组 $p < 0.05$ (Dunnett 检定)

[表7]

施用组	肝脏甘油三酯量 (mg/g组织)
媒剂	193 ± 7.5
I-13 (15mg/kg, bid)	179 ± 6.8
I-13 (45mg/kg, bid)	155 ± 7.1**

数据: 平均值 ± 标准误差

** : 相对于媒剂施用组 $p < 0.05$ (Dunnett 检定)

化合物I-12、化合物I-13施用组一起与媒剂施用组比较, 血浆中的3-羟基酪酸的浓度为高值, 在肝脏的脂肪酸氧化亢进。将结果示于图5、6及表8、9。

[表8]

施用组	血浆3-羟基酪酸[nmol/L]		
	2周	4周	7周
媒剂	142 ± 30	170 ± 55	69.3 ± 12
I-12 (3 mg/kg, bid)	128 ± 23	155 ± 31	108 ± 31
I-12 (10 mg/kg, bid)	136 ± 23	292 ± 27	119 ± 34
I-12 (30 mg/kg, bid)	189 ± 33	292 ± 82	187 ± 28*

数据: 平均值 ± 标准误差

*: 相对于媒剂施用组 $p < 0.05$ (Dunnett 检定)

[表9]

施用组	血浆3-羟基酪酸[nmol/L]				
	0周	1周	3周	5周	7周
媒剂	325 ± 24	286 ± 17	584 ± 35	543 ± 35	446 ± 31
I-13 (15 mg/kg, bid)	298 ± 27	396 ± 30**	797 ± 48*	616 ± 37	501 ± 28
I-13 (45 mg/kg, bid)	369 ± 28	378 ± 28*	688 ± 72	564 ± 77	462 ± 45

数据: 平均值 ± 标准误差

相对于媒剂施用组*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Dunnett 检定)

化合物I-12、化合物I-13施用组一起与媒剂施用组比较, 血浆中甘油三酯浓度为低值。将结果示于图7、8及表10、11。

[表10]

施用组	血浆3-羟基酪酸[nmol/L]		
	2周	4周	7周
媒介	30.1±1.7	22.7±1.8	27.0±1.8
I-12 (3 mg/kg, bid)	32.9±1.3	22.4±2.1	27.2±1.5
I-12 (10 mg/kg, bid)	30.4±2.2	21.5±1.8	22.1±1.9
I-12 (30 mg/kg, bid)	23.1±2.5*	11.1±1.1**	16.2±1.6***

数据:平均值±标准误差

相对于媒介施用组*:p<0.05,**:p<0.01,***:p<0.001 (Dunnett检定)

[表11]

施用组	血浆甘油三酯浓度[mg/dL]				
	0周	1周	3周	5周	7周
媒介	63.1±3.7	23.3±1.5	23.9±1.4	24.6±1.6	24.4±1.1
I-13 (15 mg/kg, bid)	61.6±3.1	23.7±1.0	19.8±1.2	19.0±1.7*	18.8±1.2**
I-13 (45 mg/kg, bid)	63.6±3.7	22.4±2.5	18.9±1.4*	16.5±1.7**	15.1±1.0***

数据:平均值±标准误差

相对于媒介施用组*:p<0.05,**:p<0.01,***:p<0.001 (Dunnett检定)

施用化合物I-13时,未见到肝脏的Srebfl及Fas的上升,然而肝脏中的新脂肪合成的亢进未受刺激。将肝脏中的基因表达量展示如下。

[表12]

	媒介	I-13 (mg/kg)	
		15	45
Srebfl	1.00±0.27	0.70±0.19	0.34±0.05
Fasn	1.00±0.17	0.82±0.20	0.59±0.09

数据:平均值±标准误差

[0076] 试验例6:对高脂肪饲料负荷脂肪肝自然发病小鼠的肝脏纤维化进展的效果

对8周龄、雄性的FLS.B6-Lep<ob>/Shi小鼠以高脂肪饲料(60kcal%脂肪含量、使用起酥油(shortening),含有2%胆固醇及8.7%果糖)给饵,同时将本发明化合物以成为5.5至60mg/kg/5mL的施用量的条件,悬浮于0.5%MC水溶液中,进行4周经口反复施用(b.i.d.)。在反复施用期间中从尾静脉进行采血,测定血浆中的生化学参数。施用4周后,在麻醉下进行腹部大静脉采血后,摘取肝脏。对从摘取的肝脏制成的石蜡包埋切片施行天狼星红染色。通过天狼星红阳性面积率求取肝脏中的纤维化进展的程度,并进行评价。

[0077] 在化合物I-12为5.5mg/kg的施用量中,天狼星红阳性面积率与媒介施用组比较,是有意义的低值。将结果示于图9及表13。

[表13]

施用组	天狼星红阳性面积率(%)
媒介	2.02±0.25
I-12 (5.5mg/kg, bid)	1.26±0.13*

I-12 (11mg/kg, bid)	1.52±0.18
---------------------	-----------

数据:平均值±标准误差

*:相对于媒剂施用组 $p < 0.05$ (Dunnett检定)

在化合物I-13为30、45、60mg/kg的施用量中,天狼星红阳性面积率与媒剂施用组比较,是有意义的低值。将结果示于图10及表14。

[表14]

施用组	天狼星红阳性面积率 (%)
媒剂	5.38±0.47
I-13 (30mg/kg, bid)	3.05±0.28***
I-13 (45mg/kg, bid)	2.65±0.34***
I-13 (60mg/kg, bid)	2.75±0.36***

数据:平均值±标准误差

***:相对于媒剂施用组 $p < 0.001$ (Dunnett检定)

化合物I-12、化合物I-13,均未见到肝脏中的甘油三酯量与媒剂施用组的有意义差异。将结果示于图11、12及表15、16。

[表15]

施用组	肝脏甘油三酯量 (mg/g组织)
媒剂	412±14
I-12 (5.5mg/kg, bid)	451±17
I-12 (11mg/kg, bid)	441±11

数据:平均值±标准误差

[表16]

施用组	肝脏甘油三酯量 (mg/g组织)
媒剂	263±24
I-13 (30mg/kg, bid)	234±21
I-13 (45mg/kg, bid)	211±19
I-13 (60mg/kg, bid)	235±20

数据:平均值±标准误差

化合物I-12、化合物I-13与媒剂施用组比较,血浆中的3-羟基酪酸的浓度均显示高值倾向。将结果示于图13、14及表17、18。

[表17]

施用组	血浆3-羟基酪酸[nmol/L]			
	0周	1周	2周	4周
媒剂	184±16	431±57	1129±180	924±160
I-12 (5.5 mg/kg, bid)	184±20	470±93	1108±120	1354±170
I-12 (11 mg/kg, bid)	178±8.7	449±140	1314±370	1508±380

数据:平均值±标准误差

[表18]

施用组	血浆3-羟基酪酸[nmol/L]		
	0周	1周	4周
媒剂	215±22	293±36	759±130
I-13 (30 mg/kg, bid)	252±73	397±140	1888±570
I-13 (45 mg/kg, bid)	291±130	829±490	1803±640
I-13 (60 mg/kg, bid)	217±28	351±72	1260±170

数据:平均值±标准误差

化合物I-12、化合物I-13,均未见到血浆中甘油三酯浓度与媒剂施用组的有意义差异。将结果示于图15、16及表19、20。

[表19]

施用组	血浆3-羟基酪酸[nmol/L]			
	0周	1周	2周	4周
媒剂	706±51	371±41	420±34	439±21
I-12 (5.5 mg/kg, bid)	790±95	369±32	464±30	513±23
I-12 (11 mg/kg, bid)	619±76	382±44	497±39	500±27

数据:平均值±标准误差

[表20]

施用组	血浆3-羟基酪酸[nmol/L]		
	0周	1周	4周
媒剂	658±43	262±19	522±37
I-13 (30 mg/kg, bid)	680±81	299±27	600±59
I-13 (45 mg/kg, bid)	644±89	279±40	572±54
I-13 (60 mg/kg, bid)	829±97	322±30	641±86

数据:平均值±标准误差

通过化合物I-13的施用,可见到抑制血红蛋白A1c上升的倾向。将结果示于图17及表21。

[表21]

施用组	个体编号	血红蛋白A1c [%]		血红蛋白A1c的变化[%] (施用第26日)-(施用开始前)	P值 (Dunnett检定)
		施用开始前	施用第26日		
媒剂	1	5.63	7.68	2.04	-
	2	5.95	7.44	1.49	
	3	6.67	7.80	1.14	
	4	7.16	7.30	0.138	
	5	6.72	7.22	0.501	
	6	7.22	7.17	-0.0496	
	7	5.84	7.03	1.19	
	8	6.64	6.45	-0.186	
	9	6.13	8.38	2.25	
I-13 (30 mg/kg, bid)	1	6.40	7.50	1.10	0.999
	2	6.59	9.21	2.61	
	3	6.70	7.05	0.359	
	4	6.32	6.90	0.580	
	5	7.03	7.23	0.200	
	6	7.49	8.86	1.37	
	7	7.05	7.54	0.484	
	8	6.78	7.91	1.14	
	9	6.28	7.32	1.05	
I-13 (45 mg/kg, bid)	1	6.58	7.17	0.591	0.515
	2	6.74	7.17	0.429	
	3	7.06	6.17	-0.888	
	4	5.77	5.26	-0.504	
	5	5.87	8.04	2.17	
	6	7.03	7.19	0.162	
	7	6.43	6.99	0.562	
	8	6.83	8.33	1.50	
	9	7.47	8.13	0.667	
I-13 (60 mg/kg, bid)	1	5.50	5.99	0.493	0.232
	2	6.36	6.43	0.0708	
	3	6.46	7.16	0.696	
	4	6.60	7.06	0.463	
	5	7.12	7.27	0.150	
	6	6.80	6.74	-0.0552	
	7	6.55	7.27	0.719	
	8	5.83	5.78	-0.0504	

[0078] 试验例7:对血小板数的影响

对6周龄、雄性的Cr1:CD(SD)大鼠,于未绝食下,将本发明化合物以成为50至600mg/kg/day的施用量的条件,悬浮于0.5%甲基纤维素溶液中,进行4日的经口反复施用。在施用开始第5日,于麻醉下从腹部大静脉采血,并采集血浆。通过自动血球计数装置评价血浆中的血小板数。

[0079] 化合物I-12、化合物I-13在用于评价的施用量范围内,均未影响SD大鼠的血小板数。将试验例7的结果展示如下。

[表22]

I-12	施用量	0 mg/kg/day	100 mg/kg/day	300 mg/kg/day	600 mg/kg/day
	血小板数 (N=4)		1055 ± 186	987 ± 86	988 ± 43

数据:平均值±标准偏差

[表23]

I-13	施用量	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	100 mg/kg/day	200 mg/kg/day
	血小板数 (N=4)	1164 ± 102	1079 ± 73	1048 ± 65	1122 ± 87

数据:平均值±标准偏差

[0080] 试验例8:在小鼠中与奥贝胆酸 (obeticholic acid) 的并用效果试验

对8周龄、雄性的FLS.B6-Lep^{ob}/Shi小鼠,以高脂肪饲料(脂肪含量:60kcal%,使用起酥油,含有2%胆固醇及8.7%果糖)给饵,同时将本发明化合物以成为30mg/kg/5mL的施用量的条件悬浮于0.5%MC水溶液中,进行10周的经口反复施用(b.i.d)。奥贝胆酸是以成为10mg/kg/5mL的施用量的条件悬浮于0.5%MC水溶液中,并进行10周的经口反复施用(q.d)。再者,亦设置本发明化合物30mg/kg/5mL的经口反复施用(b.i.d)和奥贝胆酸10mg/kg/5mL的经口反复施用(q.d)的并用组。在反复施用期间中,从尾静脉进行采血,测定血浆中的生化学参数及纤维化标记。施用10周后,于麻醉下进行腹部大静脉采血,然后摘取肝脏。对从摘取的肝脏制成的石蜡包埋切片施行天狼星红染色。通过天狼星红阳性面积率求取肝脏中的纤维化进展的程度,并进行评价。

其结果,通过将本发明化合物与奥贝胆酸并用,可见到比个别单独使用时更强的纤维化标记及纤维化进展的抑制。

[0081] 试验例9:小鼠中的与索马鲁肽(semaglutide)或瑞司美替罗(resmetirom)的并用效果试验

对雄性的C57BL6/J小鼠,以高脂肪饲料及果糖进行最长32周给饵后,将本发明化合物以成为最高施用量30mg/kg/5mL的条件悬浮于0.5%MC水溶液中,进行最长12周的经口反复施用(b.i.d)。索马鲁肽是以最高30nmol/kg/5mL的施用量反复皮下施用(q.d),瑞司美替罗是以最高的施用量3mg/kg/5mL进行最长12周的经口反复施用(q.d)。再者,亦设置本发明化合物30mg/kg/5mL的经口反复施用(b.i.d)与索马鲁肽或瑞司美替罗的并用组。在反复施用期间中从尾静脉进行采血,测定血浆中的生化学参数。反复施用终了后,在麻醉下进行腹部大静脉采血后,摘取肝脏。对从摘取的肝脏制成的石蜡包埋切片施行天狼星红染色。通过天狼星红阳性面积率求取肝脏中的纤维化进展的程度,并进行评价。

[0082] 试验例10:CYP抑制试验

使用市售的汇集人类肝微粒体,以人类主要CYP5分子物种(CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4)的典型基质代谢反应,即7-乙氧基试卤灵(7-ethoxyresorufin)的O-脱乙基化(CYP1A2)、甲苯磺丁脲(tolbutamide)的甲基-羟基化(CYP2C9)、美芬妥英(mephénytoin)的4'-羟基化(CYP2C19)、右美沙芬(dextromethorphan)的O-脱甲基化(CYP2D6)、特芬那定(terfenadine)的羟基化(CYP3A4)作为指标,评价通过本发明化合物抑制各种代谢物生成量的程度。

[0083] 反应条件如以下所述:基质:0.5 μ mol/L乙氧基试卤灵(CYP1A2)、100 μ mol/L甲苯磺丁脲(CYP2C9)、50 μ mol/L S-美芬妥英(CYP2C19)、5 μ mol/L右美沙芬(CYP2D6)、1 μ mol/L特芬那定(CYP3A4);反应时间:15分;反应温度:37 $^{\circ}$ C;酶、汇集的人类肝微粒体的浓度:0.2mg蛋白质/mL;本发明化合物浓度:1、5、10、20 μ mol/L(4点)。

[0084] 在96孔培养盘中,在50mmol/L HEPES缓冲液中,将5种基质的各个、人类肝微粒体及本发明化合物按照上述组成添加,添加属于辅酶的NADPH,开始进行指标的代谢反应。于37℃,反应15分钟后,通过添加甲醇/乙腈=1/1 (V/V) 溶液,使反应停止。进行3000rpm、15分钟的离心后,将离心上清液中的试卤灵 (CYP1A2代谢物) 以荧光多标识计数器 (multi-label counter) 或LC/MS/MS定量,将甲苯磺丁脲羟基化物 (CYP2C9代谢物)、美芬妥英-4'-羟基化物 (CYP2C19代谢物)、右美沙芬 (CYP2D6代谢物)、特芬那定醇体 (CYP3A4代谢物) 以LC/MS/MS定量。

[0085] 将在反应溶液中只添加溶解化合物用的溶剂,即DMSO,来代替本发明化合物者作为对照 (100%),算出残存活性 (%),并通过使用浓度及抑制率,以逻辑模式 (logistic model) 逆推算,算出 IC_{50} 。

[0086] 试验例11:CYP3A4荧光MBI试验

CYP3A4荧光MBI试验为通过代谢反应调查本发明化合物对CYP3A4抑制的增强的试验。通过CYP3A4酶 (大肠菌表达酶),将7-苄基氧基三氟甲基香豆素 (7-BFC) 脱苄基化,产生发出荧光的代谢物7-羟基三氟甲基香豆素 (7-HFC)。以7-HFC生成反应作为指标,评价CYP3A4抑制。

[0087] 反应条件如下述:基质:5.6 μ mol/L 7-BFC;预反应时间:0或30分;反应时间:15分;反应温度:25℃ (室温);CYP3A4含量 (大肠菌表达酶):预反应时62.5pmol/mL,反应时6.25pmol/mL (10倍稀释时);本发明化合物浓度:0.625、1.25、2.5、5、10、20 μ mol/L (6点)。

[0088] 在96孔培养盘中,按照上述的预反应组成,添加于K-Pi缓冲液 (pH7.4) 中的酶、本发明化合物溶液,作为预反应液;以用基质及K-Pi缓冲液稀释1/10的方式将其一部分移至另外的96孔培养盘中,添加属于辅酶的NADPH,开始指标反应 (无预反应);进行设定时间的反应后,通过添加乙腈/0.5mol/L Tris (参羟基氨基甲烷) =4/1 (V/V),使反应停止。又在残余的预反应液中,添加NADPH,开始预反应 (有预反应),于设定时间预反应后,以用基质及K-Pi缓冲液稀释成1/10的方式将其一部分移至在另外的培养盘中,开始指标反应。设定时间的反应后,通过添加乙腈/0.5mol/L Tris (参羟基氨基甲烷) =4/1 (V/V),使反应停止。将分别进行各种指标反应的培养盘通过荧光培养盘判读仪测定属于代谢物的7-HFC的荧光值。(Ex=420nm,Em=535nm)。再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0089] 以在反应系统中只添加溶解本发明化合物用的溶剂DMSO者,作为对照 (100%),算出本发明化合物以各种浓度添加时的残存活性 (%),并通过使用浓度及抑制率,以逻辑模式 (logistic model) 逆推算,算出 IC_{50} 。将 IC_{50} 值的差为5 μ mol/L以上的情况当作 (+) 为3 μ mol/L以下的情况当作 (-)。

[0090] 试验例12:CYP3A4 (MDZ) MBI试验

关于本发明化合物对CYP3A4的抑制的试验为从起因于本发明化合物对于代谢反应的抑制作用的增强,来评价基于反应机制的抑制 (mechanism based inhibition) (MBI) 能力的试验。使用汇集的人类肝微粒体,以咪达唑仑 (midazolam) (MDZ) 的1-羟基化反应作为指标,评价CYP3A4抑制。

[0091] 反应条件如下述。基质:10 μ mol/L MDZ;预反应时间:0或30分;基质代谢反应时间:2分;反应温度:37℃;汇集的人类肝微粒体的浓度:预反应时0.5mg/mL,反应时0.05mg/mL (10倍稀释时);本发明化合物预反应时的浓度:1、5、10、20 μ mol/L (4点)。

[0092] 在96孔培养盘中,按照上述的预反应组成,添加于K-Pi缓冲液(pH7.4)中的汇集人类肝微粒体、本发明化合物溶液,作为预反应液,以包含基质的K-Pi缓冲液稀释1/10的方式将其一部分移至另外的96孔培养盘中,添加属于辅酶的NADPH,开始指标反应(预反应0分钟),设定时间的反应后,通过添加甲醇/乙腈=1/1(V/V)溶液,使反应停止。又在残余的预反应液中,添加NADPH,开始预反应(预反应30分钟),于设定时间预反应后,以用包含基质的K-Pi缓冲液稀释成1/10的方式将其一部分移至另外的培养盘中,开始指标反应。设定时间的反应后,通过添加甲醇/乙腈=1/1(V/V)溶液,使反应停止。将分别进行各种指标反应的培养盘以3000rpm、15分钟的离心后,通过LC/MS/MS定量离心上清液中的1-羟基化咪达唑仑。再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0093] 以在反应液中只添加溶解化合物用的溶剂DMSO来代替本发明化合物者,作为对照(100%),算出将本发明化合物以各种浓度添加时的残存活性(%),并通过使用浓度及抑制率,以逻辑模式(logistic model)逆推算,算出IC。以预培育0分钟的IC/预培育30分钟的IC当作转移IC(Shifted IC)值,若转移IC为1.5以上则为“阳性”,若转移IC为1.0以下,则为“阴性”。

[0094] 试验例13:BA试验

经口吸收性的检讨实验材料及方法

(1) 使用动物:使用小鼠或大鼠。

(2) 饲养条件:使小鼠或大鼠自由摄取固体饲料及灭菌自来水。

(3) 施用量、分组的设定:以设定的施用量进行经口施用及静脉内施用。如以下的方法设定组。(每种化合物的施用量有变更)

经口施用2至60 μ mol/kg或1至30mg/kg (n=2至3)

静脉内施用1至30 μ mol/kg或0.5至10mg/kg (n=2至3)

(4) 施用液的制备:经口施用是以溶液或悬浮液施用。静脉内施用为于溶解后施用。

(5) 施用方法:经口施用为通过经口探测管(sonde)强制地对胃内施用。静脉内施用为通过附有注射针的注射器从尾静脉施用。

(6) 评价项目:经时地采血,使用LC/MS/MS测定血浆中本发明化合物浓度。

(7) 统计解析:关于血浆中本发明化合物浓度随时间的变化,通过动差(moment)解析法,算出血浆中浓度-时间曲线下面积(AUC),从经口施用组及静脉内施用组的施用量比及AUC比,算出本发明化合物的生物利用度(BA)。

再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0095] 试验例14:清除性(clearance)评价试验

实验材料及方法

(1) 使用动物:使用SD大鼠。

(2) 饲养条件:使SD大鼠自由摄取固体饲料及灭菌自来水。

(3) 施用量、分组的设定:依照静脉内施用所设定的施用量施用。如下的方法设定组。

静脉内施用1 μ mol/kg (n=2)

(4) 施用液的制备:使用二甲基亚砜/丙二醇=1/1溶剂溶解后施用。

(5) 施用方法:通过附有注射针的注射器从尾静脉施用。

(6) 评价项目:经时地采血,使用LC/MS/MS测定血浆中本发明化合物浓度。

(7) 统计解析:关于血浆中本发明化合物浓度随时间的变化,通过动差(moment)解析法算出全身清除性(CL_{tot})。再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0096] 试验例15:波动安姆测试(Fluctuation Ames Test)

评价本发明化合物的致突变性。

将冷冻保存的鼠伤寒沙氏杆菌(*Salmonella typhimurium* TA98株、TA100株) 20 μ L接种于10mL液体营养培养基(2.5%Oxoid nutrient broth No.2),在37 $^{\circ}$ C进行10小时振荡前培养。TA98株为将7.70至8.00mL的菌液离心(2000 \times g、10分钟),除去培养液。将菌悬浮在与离心所用的菌液相同容量的MicroF缓冲液(K_2HPO_4 :3.5g/L、 KH_2PO_4 :1g/L、 $(NH_4)_2SO_4$:1g/L、柠檬酸三钠二水合物:0.25g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0.1g/L)中,添加于120mL的暴露培养基(Exposure medium)(包含生物素:8 μ g/mL、组氨酸:0.2 μ g/mL、葡萄糖:8mg/mL的MicroF缓冲液)中。TA100株为将3.10至3.42mL的菌液添加于120至130mL的暴露培养基中,制备试验菌液。将本发明化合物DMSO溶液(从最高用量50mg/mL以2至3倍公比进行数阶段稀释)、作为阴性对照的DMSO、作为阳性对照的溶液各12 μ L,与试验菌液588 μ L(于代谢活性化条件的试验菌液498 μ L与S9mix90 μ L的混合液)混合,于37 $^{\circ}$ C进行90分钟的振荡培养,其中作为阳性对照的溶液如下:于非代谢活性化条件,针对TA98株的50 μ g/mL的4-硝基喹啉-1-氧化物DMSO溶液、针对TA100株的0.25 μ g/mL的2-(2-咪喃基)-3-(5-硝基-2-咪喃基)丙烯酰胺DMSO溶液;于代谢活性化条件,针对TA98株的40 μ g/mL的2-氨基蒽DMSO溶液、针对TA100株的20 μ g/mL的2-氨基蒽DMSO溶液。将暴露于本发明化合物的菌液460 μ L,与2300 μ L的指示培养基(Indicator medium)(包含生物素:8 μ g/mL、组氨酸:0.2 μ g/mL、葡萄糖:8mg/mL、溴甲酚紫:37.5 μ g/mL的MicroF缓冲液)混合,以各50 μ L分注于48孔/用量微培养盘的孔中,于37 $^{\circ}$ C进行3日的静置培养。包含通过氨基酸(组氨酸)合成酶基因的突变而获得增殖能力的菌的孔,由于通过pH变化从紫色变成黄色,计算每1用量的48孔中变为黄色的菌增殖孔数目,与阴性对照组比较,并评价。致突变性为阴性者以(-)表示为阳性者以(+)表示。

再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0097] 试验例16:hERG试验

本试验以评价本发明化合物的心电图QT间隔延长风险为目的,使用表达human ether-a-go-go related gene(hERG)通道的CHO细胞,来检讨本发明化合物对于在心室再极化过程中扮演重要角色的延迟整流K⁺电流(I_{Kr})的作用。

使用全自动膜片箝制(patch clamp)系统(QPatch;Sophion Bioscience A/S),通过全细胞(whole cell)膜片箝制法,将细胞保持于-80mV的膜电位,赋予-50mV的泄漏电位后,记录赋予+20mV的去极化刺激2秒,再赋予-50mV的再极化刺激2秒时所诱发的I_{Kr}。以将二甲基亚砷调整为0.1%的细胞外液(NaCl:145mmol/L、KCl:4mmol/L、CaCl₂:2mmol/L、MgCl₂:1mmol/L、葡萄糖:10mmol/L、HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid;4-(2-羟基乙基)-1-哌乙磺酸):10mmol/L、pH=7.4)当作媒剂,将媒剂及使本发明化合物以目标浓度溶解的细胞外液分别于室温条件下,施用于细胞7分钟以上。使用解析软件(QPatch Assay software;Sophion Bioscience A/S),以于保持膜电位的电流值为基准,从所得到的I_{Kr}计测最大尾电流(tail current)的绝对值。再者,算出施用本发明化合物后

的最大尾电流对施用媒剂后的最大尾电流,作为抑制率,评价本发明化合物对 I_{Kr} 的影响。再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0098] 试验例17:安姆(Ames)试验

通过以鼠伤寒沙氏杆菌(*Salmonella typhimurium*) TA98株、TA100株、TA1535株、TA1537株及大肠菌(*Escherichia coli*) WP2uvrA株作为试验菌株的安姆(Ames)试验,评价本发明化合物的致突变性。在本发明化合物的DMSO溶液0.1mL中,于代谢活性化条件下混入0.5mL的S9mix,于非代谢活性化条件下混入0.5mL的磷酸缓冲液与0.1mL的试验菌液,与2mL的含有组氨酸及生物素、或色氨酸的叠层用软琼脂一起叠层于最少葡萄糖琼脂平板上。同时,对于阴性对照物质(DMSO)及阳性对照物质(2-(2-呋喃基)-3-(5-硝基-2-呋喃基)丙酰胺、叠氮化钠、9-氨基吡啶、或2-氨基蒽),亦以同样方式实施。在37℃进行48小时培养后,计算所出现的回复突变菌落数,并与阴性对照组比较进行评价。将回复突变菌落数以浓度依存方式增加,且成为阴性对照组的菌落数的2倍以上情况,判断为阳性(+).再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0099] 试验例18:光溶血试验

使本发明化合物以目标浓度溶解,在微培养盘上,与从羊脱纤维血制备的0.1至0.0008%浓度的红血球浮游液(2.5v/v%)混合,使用紫外线荧光灯(GL20SE灯、三共电气及FL20S-BLB灯, Panasonic),进行UVA及UVB区域的光照射($10\text{J}/\text{cm}^2$, 290至400nm)。采集光照射終了后的混合液,进行离心。采集离心后的上清液并移至微培养盘后,测定上清液的吸亮度(540或630nm),根据吸亮度进行判定。将于540及630nm的吸亮度分别作为活体膜损伤(光溶血率%)及脂质膜过氧化(产生变性血红蛋白)的指标。将光溶血率小于10%,且于630nm的吸亮度的变化量小于0.05的情况当作(-),将光溶血率为10%以上或于630nm的吸亮度的变化量为0.05以上情况当作(+).

[0100] 试验例19:P-gp基质试验

在单层培养人类MDR1表达细胞或母细胞的Transwell(注册商标, CORNING公司)的单侧添加本发明化合物,使其反应一定时间。对于MDR1表达细胞及母细胞,算出从顶端(Apical)至底侧面(Basolateral)方向(A→B)及从底侧面(Basolateral)至顶端(Apical)方向(B→A)的膜透过系数,算出MDR1表达细胞与母细胞的流出比(Efflux Ratio)(ER; B→A及A→B的膜透过系数的比)值。比较MDR1表达细胞与母细胞的流出比(Efflux Ratio)(ER值),判断本发明化合物是否为P-gp基质。

[0101] 试验例20:溶解性试验

本发明化合物的溶解度为于添加1%DMSO的条件下决定。通过DMSO制备10mmol/L的化合物溶液。将2 μL 的本发明化合物溶液分别添加于198 μL 的JP-1液、JP-2液。在室温振荡1小时后,将混液抽吸过滤。将滤液以甲醇/水=1/1(V/V)或乙腈/甲醇/水=1/1/2(V/V/V)稀释10或100倍,通过绝对校正线法,使用LC/MS或固相萃取(SPE)/MS,测定滤液中浓度。再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0102] JP-1液的组成,如下所述。

在2.0g的氯化钠、7.0mL的盐酸中加水,调成1000mL。

JP-2液的组成,如下所述。

将3.40g的磷酸二氢钾及3.55g的无水磷酸氢二钠溶于水中,调成1000mL,然后在

其1容量中,加水1容量。

[0103] 试验例21:粉末溶解度试验

在适当容器中适量加入本发明化合物,于各容器中分别添加JP-1液(在2.0g的氯化钠、7.0mL的盐酸中加水,成为1000mL)、JP-2液(将3.40g的磷酸二氢钾及3.55g的无水磷酸氢二钠溶于水中,调成1000mL,然后在其1容量中添加水1容量)、20mmol/L牛胆酸钠(TCA)/JP-2液(在1.08g的TCA中添加JP-2液,调成100mL)各200 μ L。在添加试验液后全量溶解的情况,适当地追加本发明化合物。密闭,于37 $^{\circ}$ C振动1小时后过滤,在100 μ L的各滤液中添加100 μ L的甲醇,进行2倍稀释。稀释倍率为视需要变更。确认是否无气泡及析出物,密闭并振动。通过绝对校正线法,使用HPLC,定量本发明化合物。再者,稀释浓度或稀释溶剂为视需要变更。

[0104] 试验例22:目视溶解性试验

在微量试验管3支中各称取化合物约5mg,添加各种媒剂(注射用水、生理食盐水注射液、0.5%葡萄糖液),至化合物浓度成为20%。以涡流搅拌后,通过目视确认有无溶解。若溶解,则当作于该媒剂的溶解度 $>20\%$ 。在那些试验液中进一步添加各媒剂(注射用水、生理食盐水注射液、葡萄糖液),制备化合物浓度10%的试验液,以涡流搅拌后,通过目视确认有无溶解。若溶解则将于该媒剂的溶解度当作20%至10%。以同样方式试验至5%浓度、2.5%浓度、1%浓度为止,在以1%浓度仍未溶解的情况,当作于其媒剂的溶解度 $<1\%$ 。测定1%浓度的试验液的pH,并记录。再者,稀释浓度或稀释溶剂可视需要变更。

[0105] 试验例23:pKa测定(毛细管电泳法(capillary electrophoresis法,CE法)的测定方法)

通过使用毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis)技术的手法为将包含电解质的缓冲液中,利用各试料成分的自由泳动的分离方法。

在充填调至pH2.5至11.5的缓冲液的熔融硅石毛细管中,注入化合物溶液后,若对毛细管施加高电压(Inlet侧+,Outlet侧-),则化合物以反映缓冲液pH的离子化状态的速度(+投入的化合物快速,-投入的化合物迟缓)移动。将此化合物的移动时间与中性分子(DMSO)的移动时间的差,相对于pH作图,进行拟合(fitting),算出pKa。将测定条件展示于下。

使用装置:Beckman P/ACE系统MDQ PDA

泳动液:pH2.5至11.5缓冲液(含有10vol%MeOH)

样本溶液:空白DMSO 10 μ L+注用水90 μ L混合

样本10mM DMSO储液4 μ L+DMSO 6 μ L+注用水90 μ L

(方法)

毛细管:熔融硅石毛细管(BECKMAN COULTER,内径50 μ m,全长30.2cm,有效长度20.0cm)

外加电压:10kV(331V/cm)

外加空气压:0.7psi

毛细管温度:25 $^{\circ}$ C

电渗透流标记:DMSO

检测:紫外部多波长吸光检测(测定波长:215nm、238nm)

试料注入:加压法(0.5psi,5sec)

[0106] 以下所示的制剂例不过为例示者,并非意图对发明的范围予以任何限定。

本发明的化合物可通过任何先前的途径,作为药物组合物施用,尤其经肠(例如经口),例如以片剂或胶囊剂的方案施用,或非经口,例如以注射液剂或悬浮剂的方案施用,或局部地,例如以冲洗剂、凝胶剂、软膏剂或乳膏剂的方案施用,或以经鼻方案或栓剂方案施用。同时包含至少1种药学上可容许的载剂或稀释剂,及游离方案或药学上可容许的盐的方案的本发明化合物的药物组合物,可依照先前的方法,通过混合、造粒或被覆法而制造。例如,就经口用组合物而言,可形成含有赋形剂、崩散剂、黏合剂、润滑剂等及有效成分等的片剂、颗粒剂、胶囊剂。又,就注射用组合物而言,可形成溶液剂或悬浮剂,可灭菌,又,亦可含有保存剂、稳定化剂、缓冲化剂等。

工业实用性

[0107] 可以认为本发明的非酒精性脂肪肝病的治疗和/或预防方法、及其所用的治疗用药物组合物通过将活性成分的式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的设定量施用至非酒精性脂肪肝病的患者,显示优良治疗效果。又,由于通过式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐的施用,未见到血浆甘油三酯上升或血小板浓度降低等副作用,可极安全地施用,亦适于长期间的施用,故本发明的治疗和/或预防方法及治疗用药物组合物为极优良的治疗和/或预防方法及治疗用药物组合物。

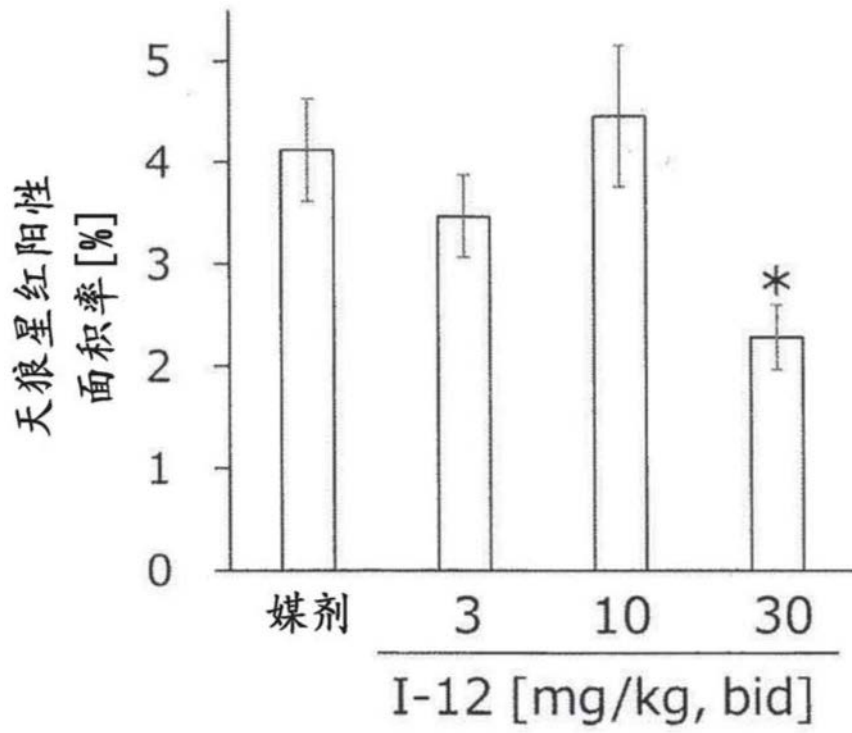


图1

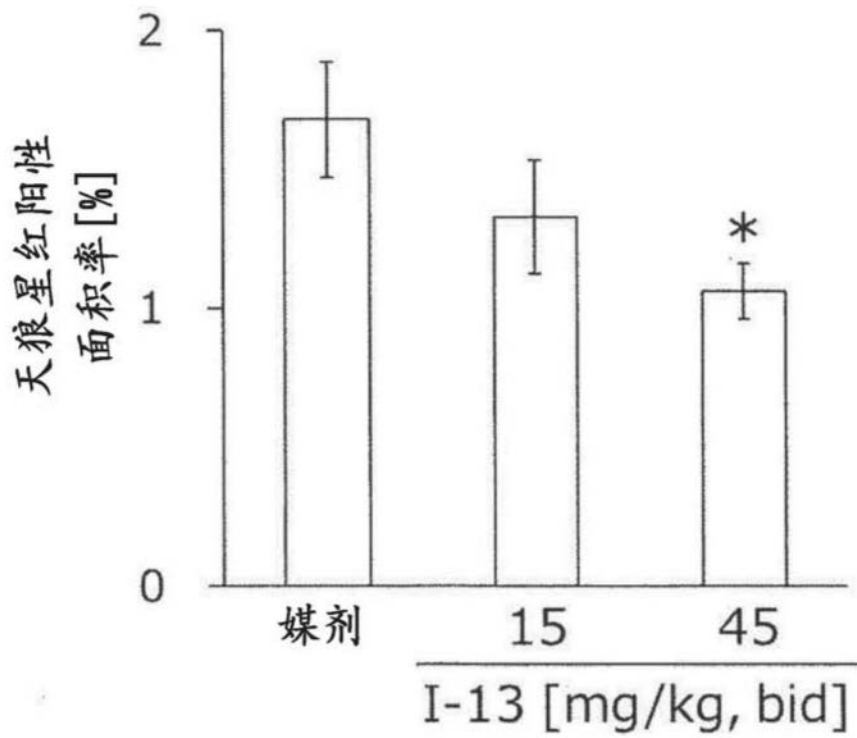


图2

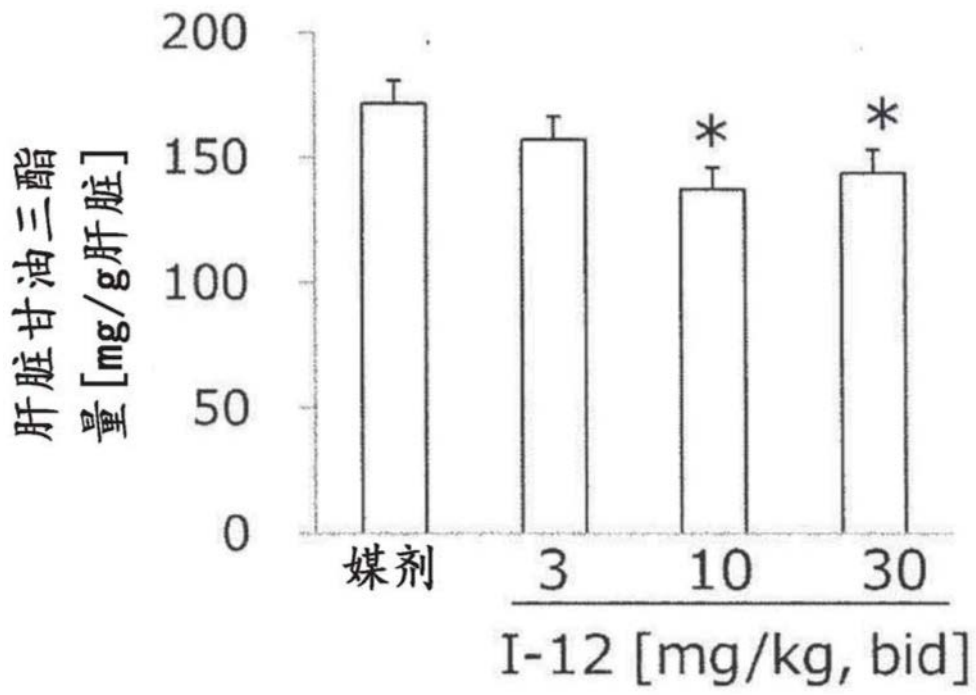


图3

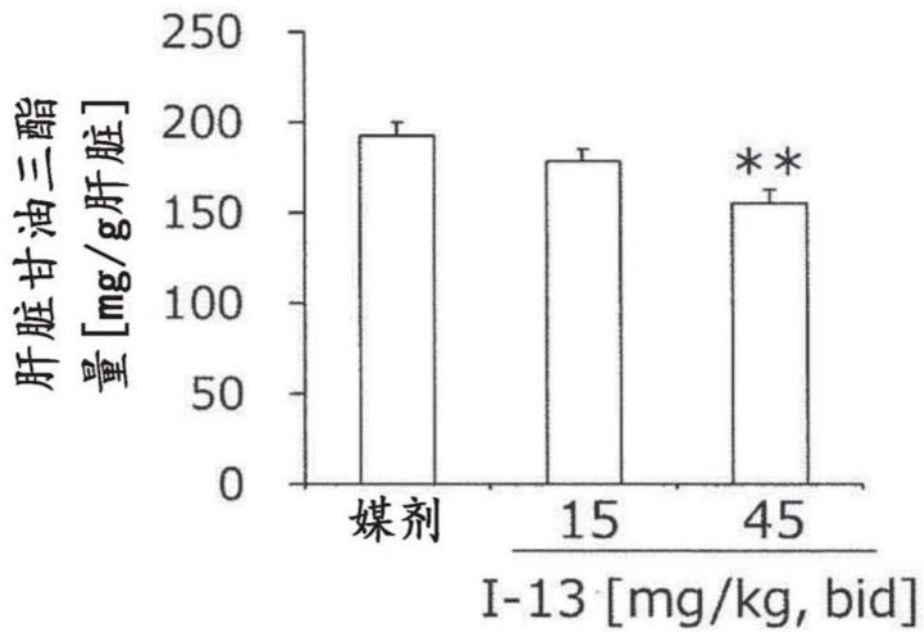


图4

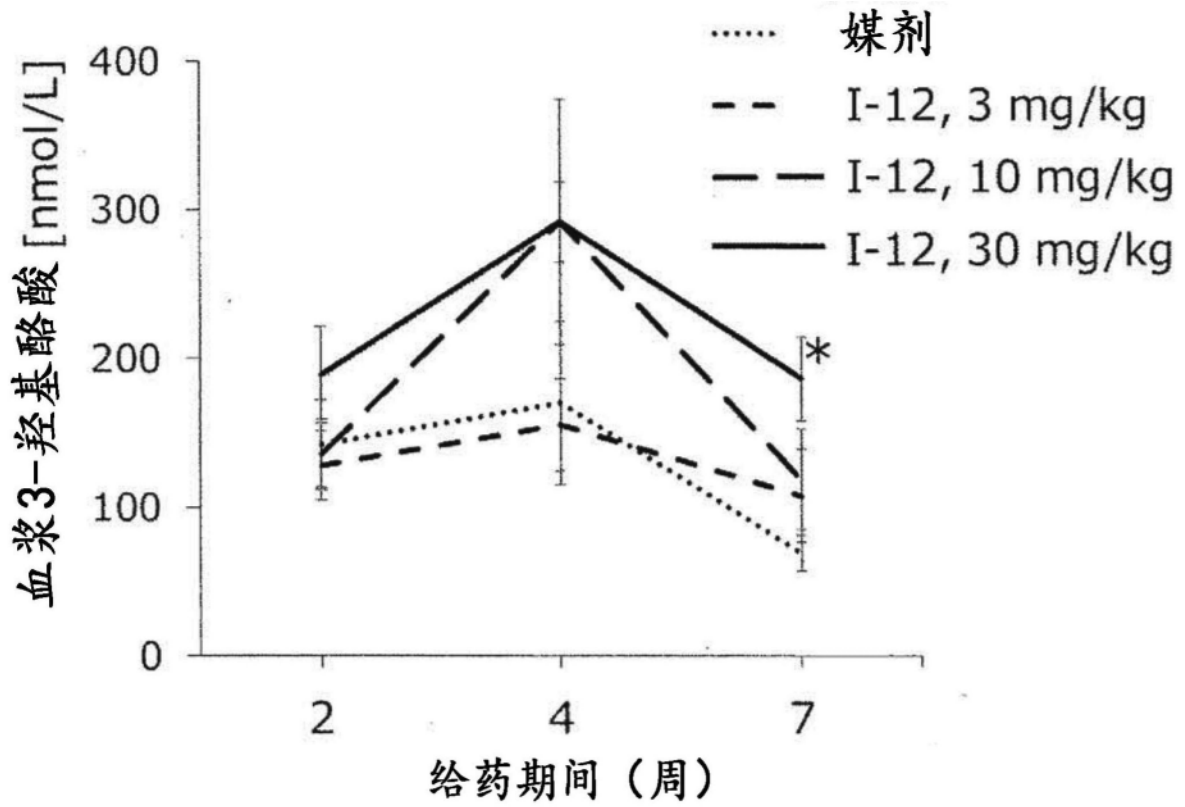


图5

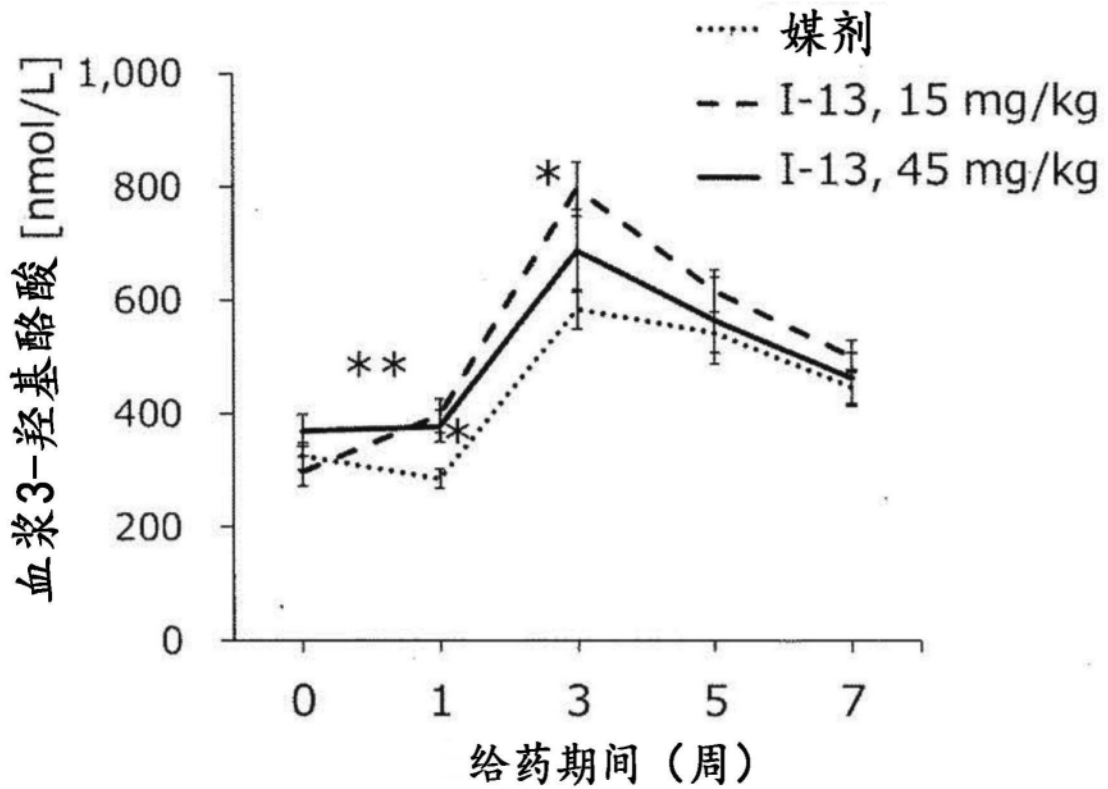


图6

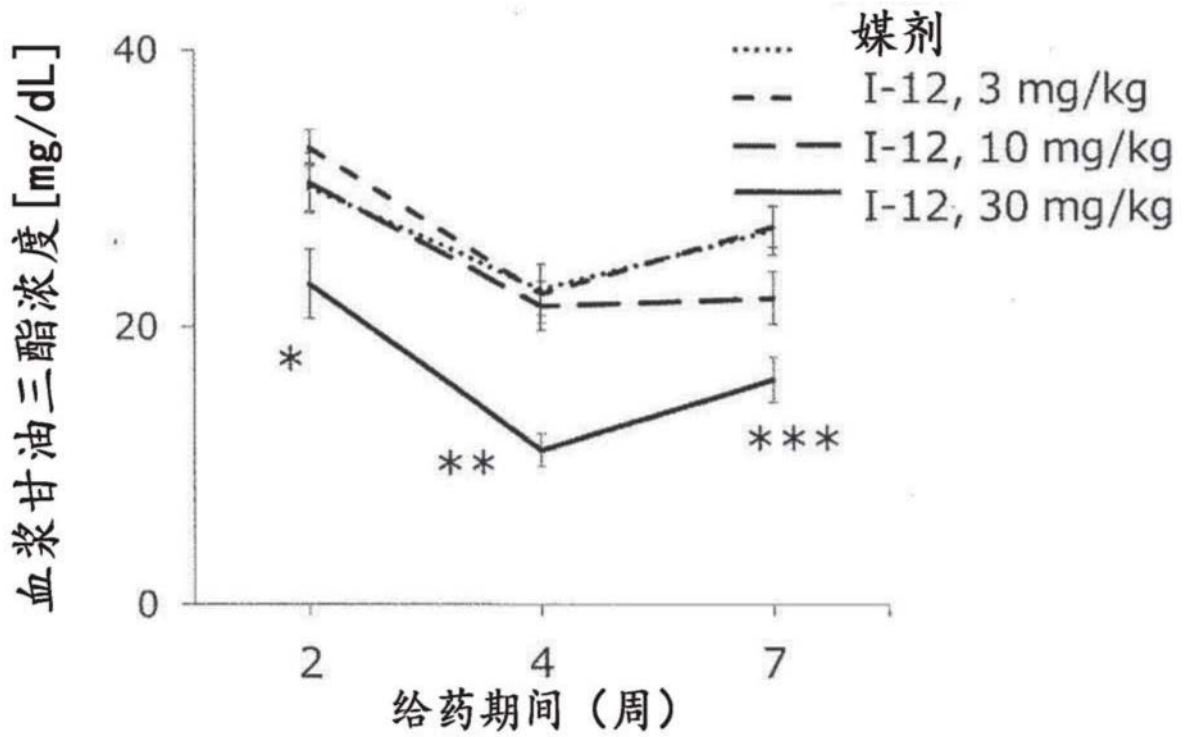


图7

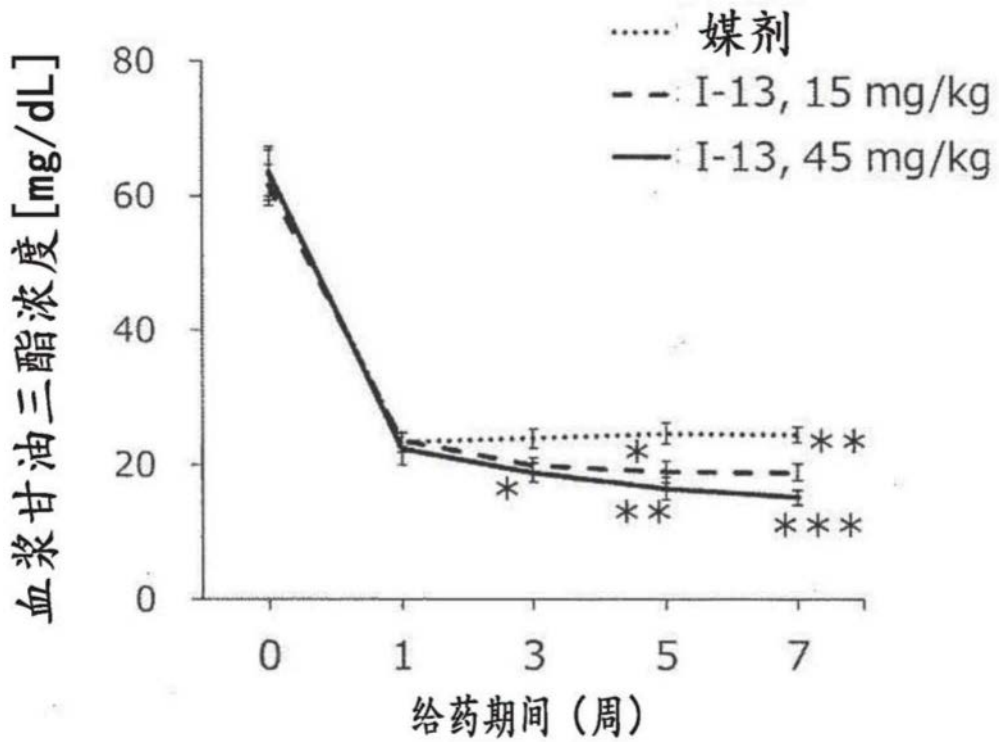


图8

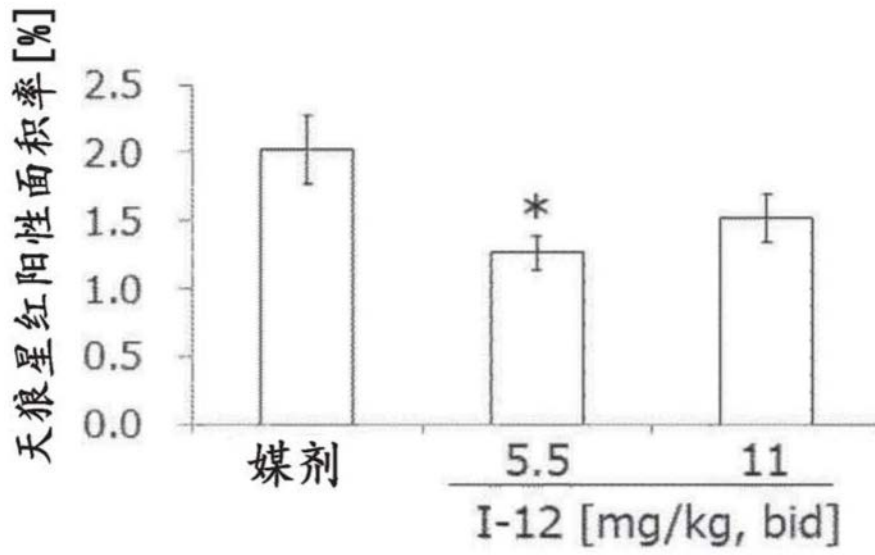


图9

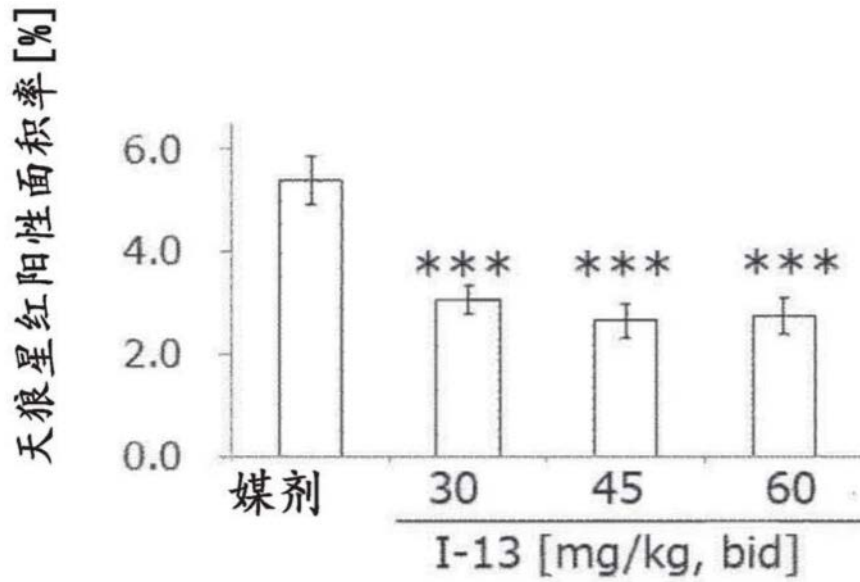


图10

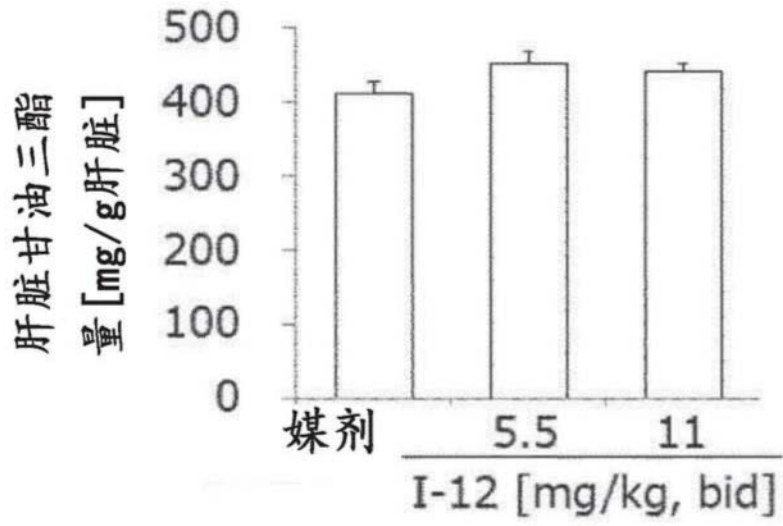


图11

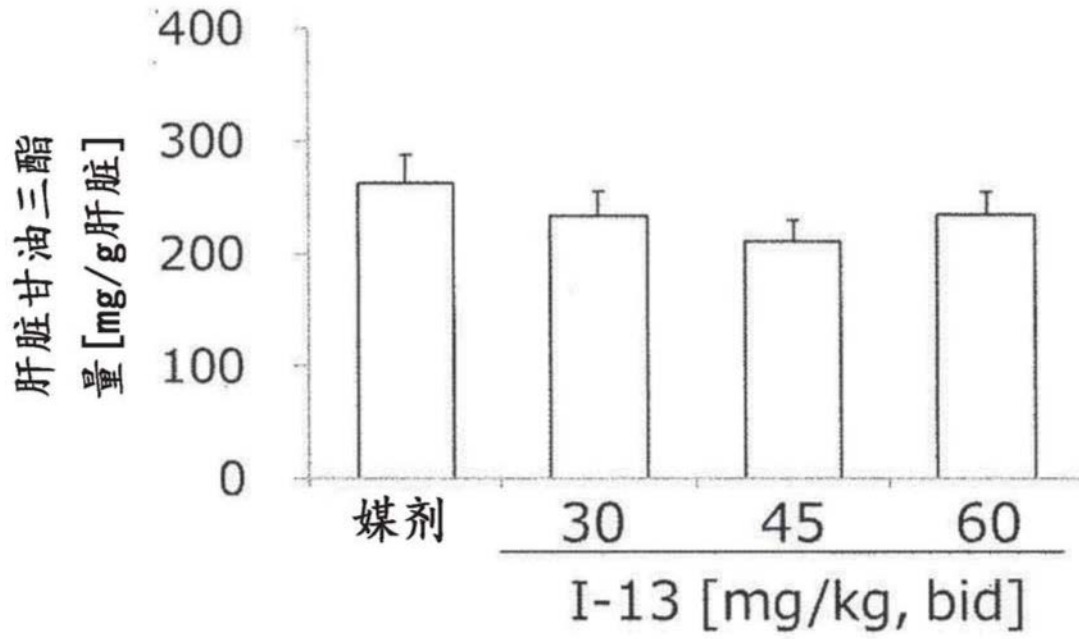


图12

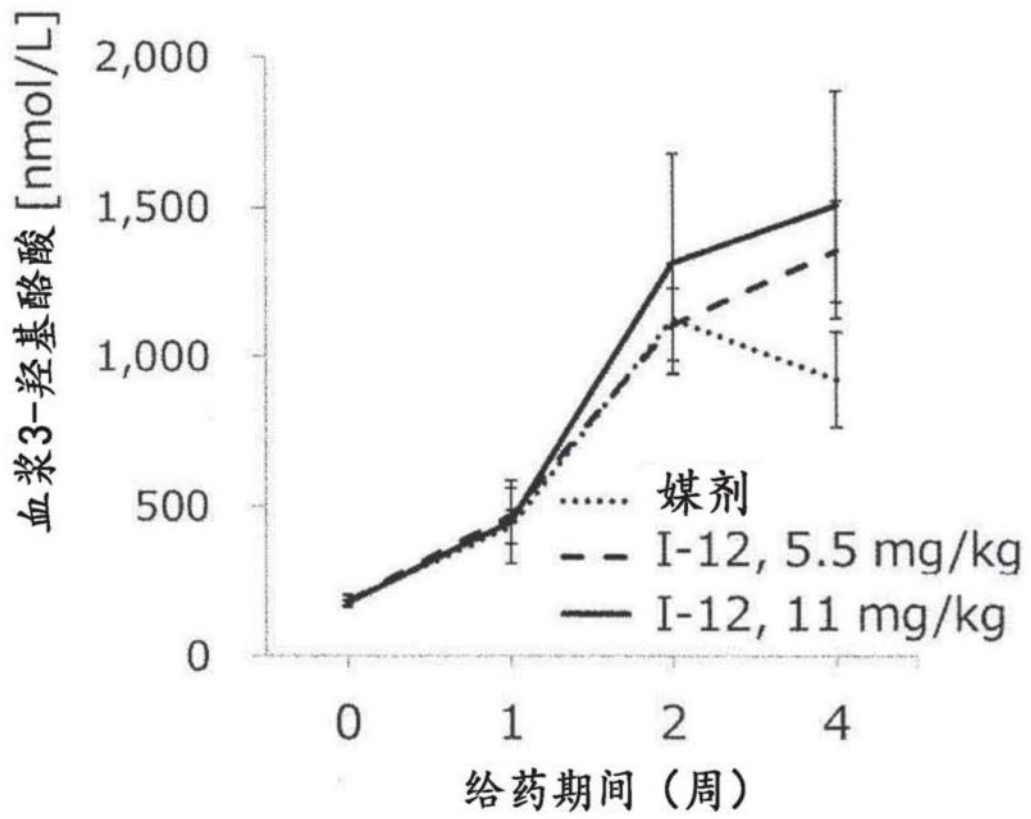


图13

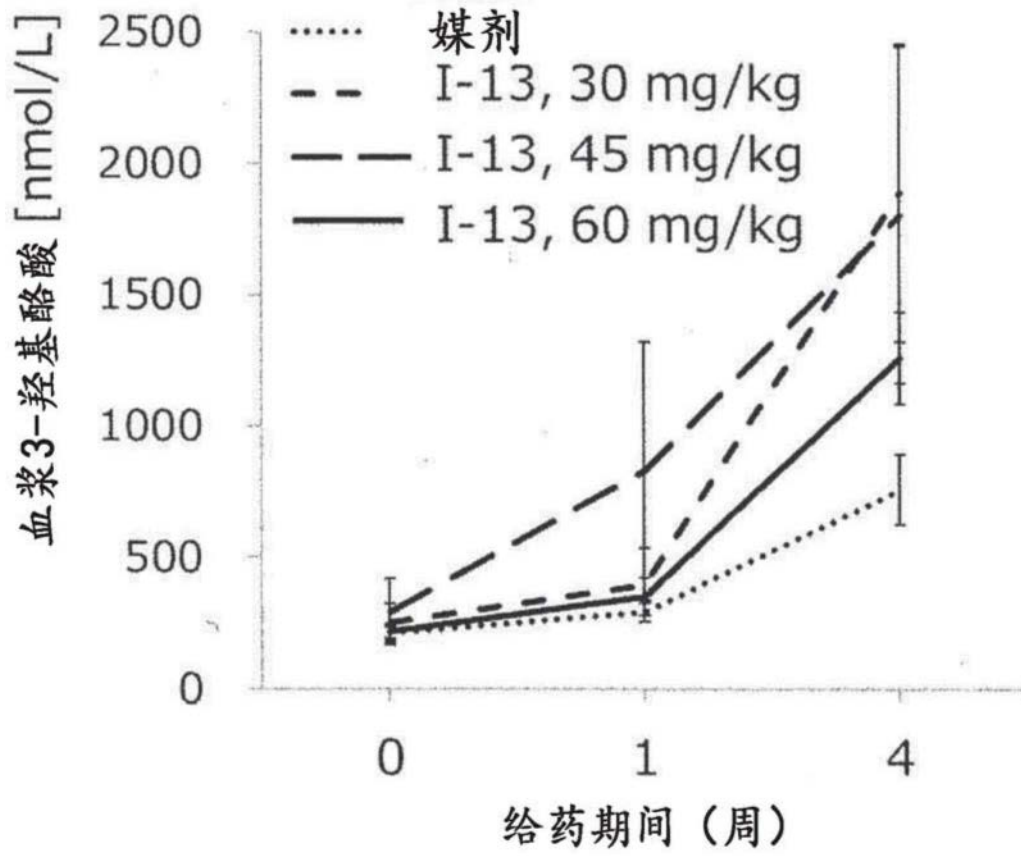


图14

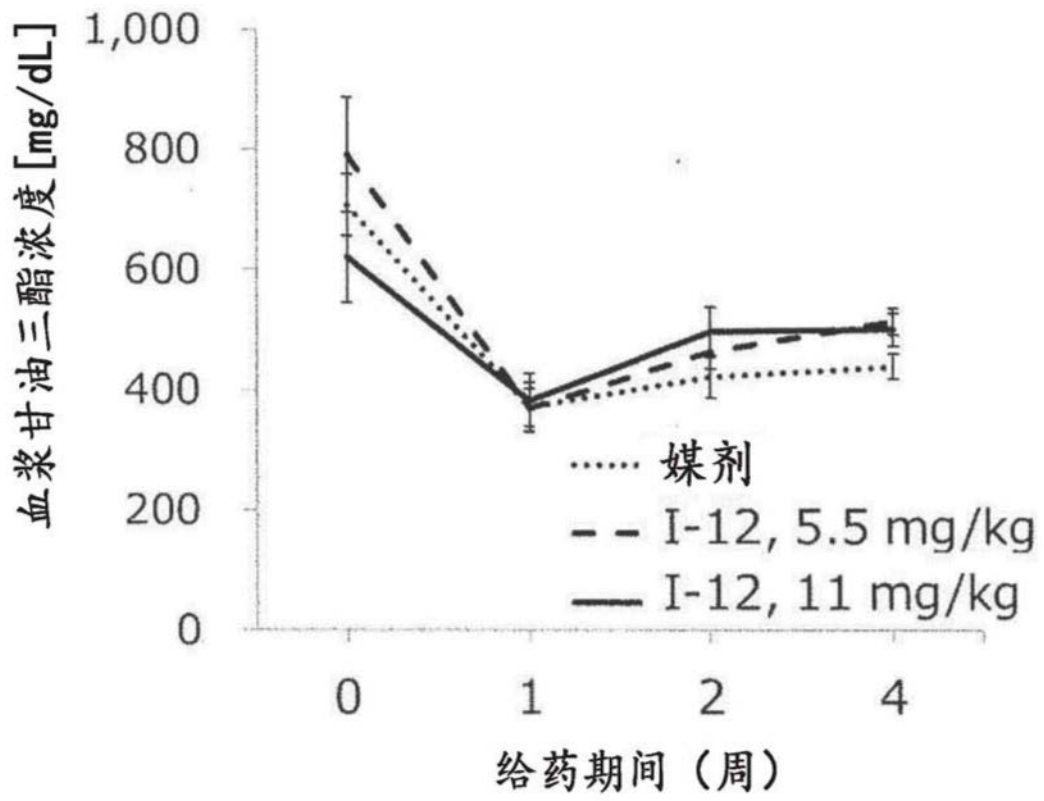


图15

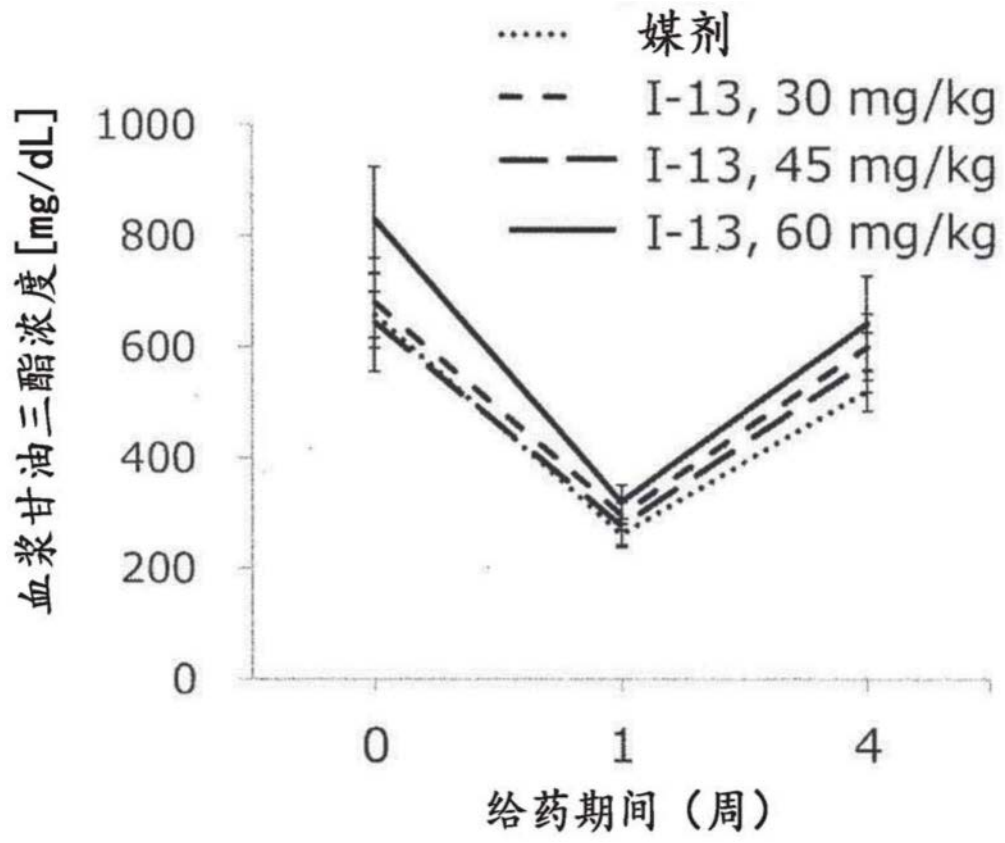


图16

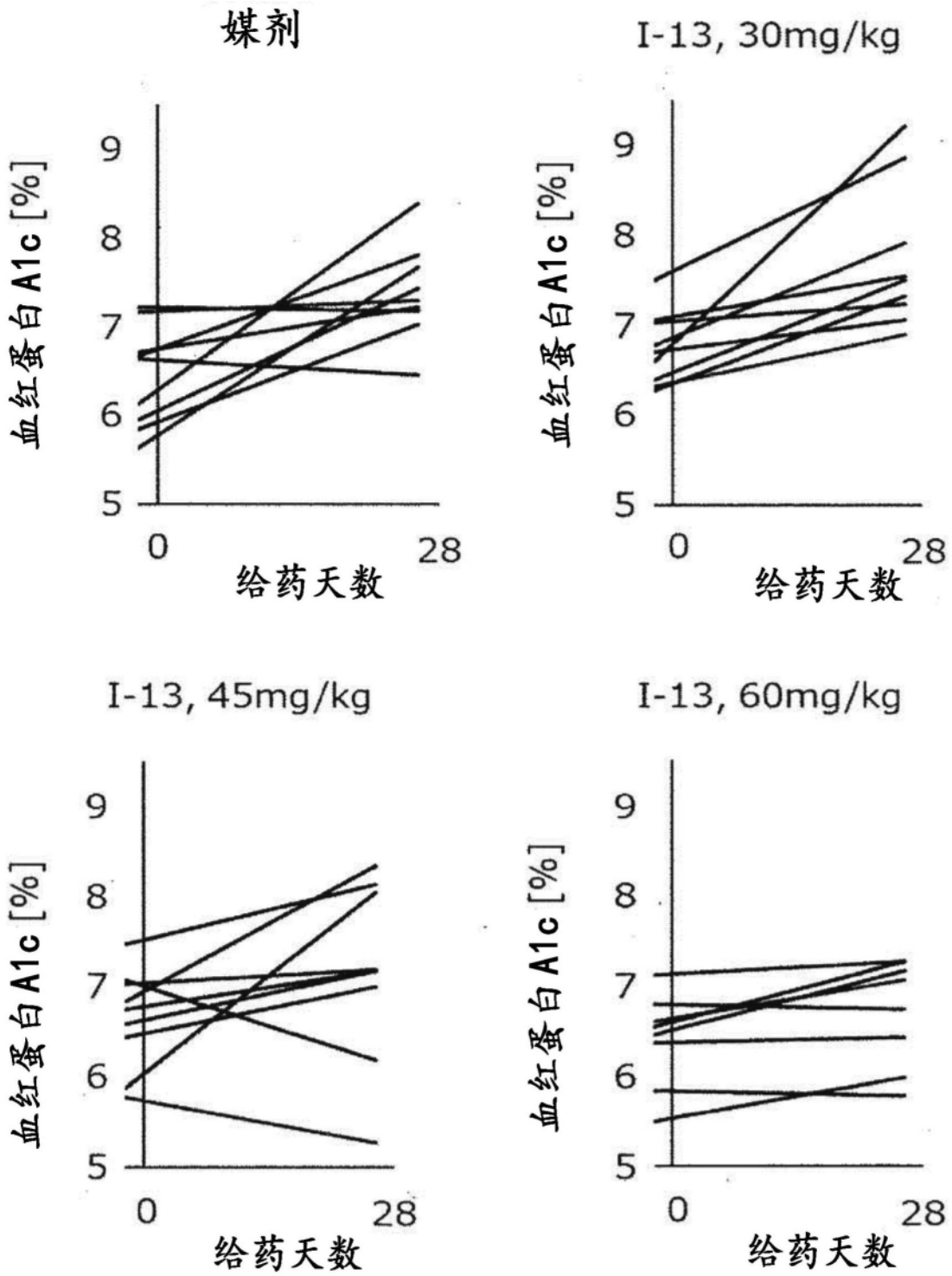


图17