



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114129562 A

(43) 申请公布日 2022. 03. 04

(21) 申请号 202010914441.8

(22) 申请日 2020.09.03

(71) 申请人 中国科学院大连化学物理研究所  
地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山路457-41号

(72) 发明人 梁鑫淼 王纪霞 刘艳芳 魏来  
赵耀鹏 张岩 吴乐昊 相凯婧

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 马驰

(51) Int. Cl.

A61K 31/41 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

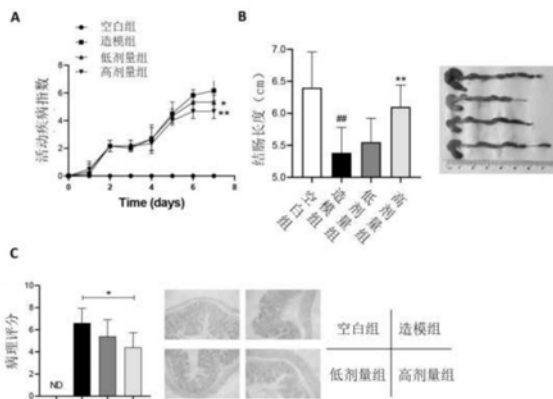
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

香豆素类衍生物在制备治疗炎症性肠炎药物中应用及药物

(57) 摘要

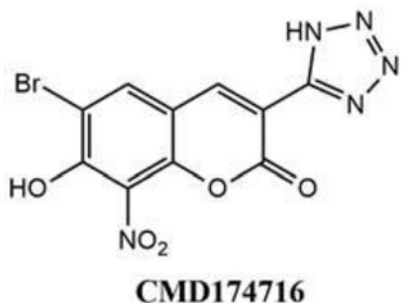
本发明公开了一种香豆素类衍生物在制备治疗炎症性肠炎药物中的应用。香豆素类衍生物6-溴-7-羟基-8-硝基-3-(1H-四唑-5-基)-2H-苯并吡喃-2-酮(CMD174716)经细胞和动物药效实验发现其对大鼠小肠隐窝上皮细胞划痕具有显著的促进伤口愈合能力,且在DSS诱导小鼠炎症性肠炎模型具有较好的治疗作用。因此,CMD174716可用于制备治疗炎症性肠炎的药物。本发明所述CMD174716在制备治疗炎症性肠炎的药物为由CMD174716作为活性成分与常规药用载体制成的药物组合物。所述药物组合物可以是片剂、颗粒剂、胶囊剂、缓释片、滴丸、注射剂、粉针剂或气雾剂等。本发明为治疗炎症性肠炎提供了新的药物,有较好的临床应用前景。



1. 一种香豆素类衍生物在制备治疗炎症性肠炎药物中的应用,其特征在于:所述香豆素类衍生物为6-溴-7-羟基-8-硝基-3-(1H-四唑-5-基)-2H-苯并吡喃-2-酮(简称之为CMD174716)。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:

所述CMD174716的结构式如下:



3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于:所述CMD174716在人源或鼠源的GPR35受体上具有纳摩尔级的激动活性。

4. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于:所述CMD174716在大鼠小肠隐窝上皮细胞划痕模型中能显著促进细胞的迁移。

5. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于:所述CMD174716在DSS诱导小鼠炎症性肠炎模型上具有较好的治疗作用。

6. 一种治疗炎症性肠炎药物,其特征在于:所述药物是以CMD174716作为活性成份或唯一药效成分。

7. 根据权利要求6所述的治疗炎症性肠炎药物,其特征在于:所述药物是以CMD174716作为活性成份或唯一药效成分与药物学上可接受的药用载体制成的药物组合物。

8. 根据权利要求6或7所述的治疗炎症性肠炎药物,其特征在于:所述药物组合物为片剂、颗粒剂、胶囊剂、缓释片、滴丸、注射剂、粉针剂或气雾剂等。

## 香豆素类衍生物在制备治疗炎症性肠炎药物中应用及药物

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及香豆素类衍生物在制备抗炎症性肠炎药物中的用途,具体涉及一种合成的6-溴-7-羟基-8-硝基-3-(1H-四唑-5-基)-2H-苯并吡喃-2-酮(CMD174716)香豆素类衍生物在制备抗炎症性肠炎药物中的用途。

### 背景技术

[0002] 炎症性肠病(IBD)是一种慢性、反复发作和严重的胃肠道炎症性疾病,分为克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),发病症状包括腹痛、持续性腹泻、痉挛、胃肠道出血、体重减轻和疲劳等(Ashton, J.J.; et al. *Lancet* 2019, 393, 1672-1674.)。全球IBD的发病率和流行率逐年升高,且临床数据显示缓解率最高仅为40%(Farooq, S.M.; et al. *Dig. Dis. Sci.* 2018, 63, 2910-2922.)。当前用于IBD治疗的药物主要有氨基水杨酸、皮质类固醇和免疫抑制剂等(Ishii, M., *Br. J. Pharmacol.* 2017, 174, 1875-1880.)。但是长期使用这些药物可能会导致严重副作用如高血压和狼疮。因此,发现用于治疗IBD的有效药物具有重要的临床意义。

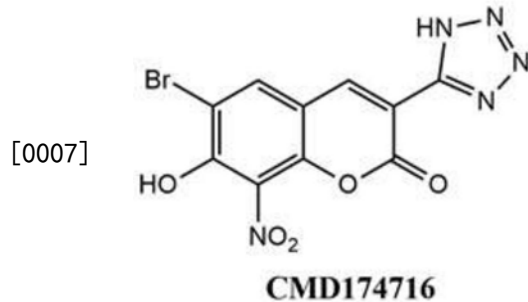
[0003] G蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)是细胞信号传导中最重要的一类膜受体,也是小分子药物开发中最受关注的药物靶点之一,大约34%的现代药物直接靶向该受体家族(Hauser, A.S.; et al. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017, 16, 829-842.)。GPR35是在1998年发现的一种A类视紫红质样的孤儿GPCR(B.F.O'Dowd, et al. *Genomics* 47 (1998) 310-313.),它含有309个氨基酸,在人与鼠之间仅有70%的同源性,高表达于小肠、结肠及胰腺组织,在心脏、免疫细胞、背部神经节及脊髓中也有相当的表达(D.M.Shore, et al. *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 1-22.)。全基因组关联分析结果表明GPR35基因是IBD的高风险基因(Xiao, Y.; et al. *World J Gastrointest* 2016, 22, 5578-5588.),研究还发现GPR35介导的信号传导有助于硫酸葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的IBD小鼠模型中结肠上皮的黏膜修复(Tsukahara, T.; et al. *Pharmacol. Res.* 2017, 123, 27-39.),GPR35的敲除加剧IBD症状(Farooq, S.M.; et al. *Dig. Dis. Sci.* 2018, 63, 2910-2922.)。这些研究表明GPR35为IBD治疗提供了新的治疗靶点。

[0004] 目前已发现的GPR35激动剂有内源性犬尿酸(Wang, J.; et al. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 22021-22028.)和溶血磷脂酸(Oka, S.; et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 395, 232-237.),但由于活性差备受质疑。后续发现的敏喘宁、呋喃苯胺酸、布美他尼、色苷酸、帕莫酸和噻唑烷二酮类衍生物(Shore, D.M.; et al. *Front. Pharmacol.* 2015, 6, 1-22.),因靶点选择性不专一、活性不高、或者在人和鼠GPR35的活性相差十倍甚至上千倍,限制了进一步的药物开发。梁鑫淼团队报道了一类3-取代香豆素类衍生物具有较强的GPR35激动活性(专利申请号:201611014811.2),表现出较好的成药理化属性。本发明基于3-取代香豆素类衍生物,通过体内体外的药效评价,首次公开了6-溴-7-羟基-8-硝基-3-(1H-四唑-5-基)-2H-苯并吡喃-2-酮(CMD174716)在制备治疗炎症性肠炎药物中的应用,具有良好的临床药物研发潜力。

## 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于研究香豆素类衍生物6-溴-7-羟基-8-硝基-3-(1H-四唑-5-基)-2H-苯并吡喃-2-酮 (CMD174716) 在制备治疗炎症性肠炎药物中的应用。

[0006] 本发明提供了一种香豆素类衍生物6-溴-7-羟基-8-硝基-3-(1H-四唑-5-基)-2H-苯并吡喃-2-酮 (CMD174716) 在制备治疗炎症性肠炎药物中的应用。CMD174716的结构式如下：



[0008] 本发明将CMD174716进行了人源和鼠源GPR35受体的剂量活性测定,发现此化合物都表现出纳摩尔级的激动活性,而纳摩尔级活性是药物开发的优势属性,为后续的药物研究提供了高活性的先导活性分子。

[0009] 本发明将CMD174716在大鼠小肠隐窝上皮细胞划痕模型进行了体外药效实验,发现CMD174716给药组的细胞划痕伤口愈合百分比高于空白组,说明CMD174716能显著的促进上皮细胞的迁移。在DSS诱导小鼠炎症性肠炎模型上,CMD174716能明显抑制DSS诱导引起结肠变短的效应,且能降低IBD的活动疾病指数(DAI),说明CMD174716具有治疗IBD的药效。因此,CMD174716可用于制备治疗炎症性肠炎的药物。

[0010] 本发明所述CMD174716在制备治疗炎症性肠炎的药物为由CMD174716作为活性成分与常规药用载体制成的药物组合物。所述药物组合物可以为片剂、颗粒剂、胶囊剂、缓释片、滴丸、注射剂、粉针剂或气雾剂等。本发明为治疗炎症性肠炎提供了新的药物,具有较好的临床应用价值。

## 附图说明

[0011] 图1CMD174716在人源hGPR35和鼠源mGPR35的活性测定。(A) 不同剂量CMD174716在HT-29细胞上的DMR响应信号曲线;(B) 不同剂量CMD174716在CHO-K1-mGPR35细胞上的DMR响应信号曲线;(C) CMD174716在HT-29、CHO-K1-mGPR35和CHO-K1的剂量响应曲线。

[0012] 图2CMD174716在大鼠小肠隐窝上皮细胞划痕模型的体外药效评价。(A) 不同浓度CMD174716给药6h后伤口修复百分比;(B) 不同浓度CMD174716给药24h后伤口修复百分比。

[0013] 图3CMD174716在DSS诱导小鼠炎症性肠炎模型的药效评价。(A) 空白组、造模组、低剂量组(1mg/kg)和高剂量组(5mg/kg)的活动疾病指数;(B) 空白组、造模组、低剂量组(1mg/kg)和高剂量组(5mg/kg)的结肠长度;(C) 空白组、造模组、低剂量组(1mg/kg)和高剂量组(5mg/kg)的病理评分。

## 具体实施方式

[0014] 现结合实例,对本发明做进一步说明。实例仅限于说明本发明,而非对本发明的限

定。

[0015] 实施例1 CMD174716的GPR35活性测定

[0016] CMD174716化合物的制备方法可参考现有有机物合成方法进行合成,例如:可参见公开专利3-取代香豆素衍生物及应用和GPR35受体的激动剂中的实施例3(专利号CN201611014811.2)。HT-29和CHO-K1细胞购于中国科学院上海细胞库,HT-29细胞内源性高表达hGPR35受体。CHO-K1-mGPR35的细胞模型构建方法可参考现有细胞模型构建方法进行构建方法,例如:可参见公开专利鼠源GPR35高通量筛选模型的构建方法及应用中的实施例1和实施例2(专利号:CN201711354062.2)。Epic检测平台及Epic®384孔板购于Corning。检测平台为Corning第三代Epic®成像仪,检测的信号为细胞动态质量重置(DMR)引起的波长位移,称为DMR信号。

[0017] 将处于对数生长期的HT29细胞接种到Epic板中,每孔40 $\mu$ L,  $3.2 \times 10^4$  cells/well, 将接种好的细胞板置于细胞培养箱中培养约20-22h。将板孔中的培养基更换为HBSS缓冲液平衡1h后,将CMD174716作用(加入每孔中)于HT-29细胞,终浓度为50nM, 25nM, 12.5nM, 6.25nM, 3.13nM, 1.56nM和0.78nM,对化合物不同浓度的响应信号实时记录1h,得到相应的DMR信号谱如图1A所示,不同浓度产生不同强度的DMR响应曲线,且随着浓度的升高DMR信号增强。

[0018] 采用与上述过程相同的步骤和培养条件检测CMD174716作用于CHO-K1-mGPR35的DMR信号谱,不同之处在于:其中CHO-K1-mGPR35细胞的接种密度为 $1.5 \times 10^4$  cells/well, CMD174716终浓度为125nM, 62.5nM, 31.25nM, 15.63nM, 7.81nM, 3.91nM, 1.95nM和0.12nM,得到相应的DMR信号谱如图1B所示,不同浓度产生不同强度的DMR响应曲线,且随着浓度的升高DMR信号增强。根据浓度-响应强度关系,通过S曲线拟合获得图1C,从图中可以看出CMD174716能剂量依赖的产生DMR信号,计算CMD174716在hGPR35和mGPR35细胞的EC<sub>50</sub>值分别是 $5.80 \pm 1.10$  nM和 $11.02 \pm 0.77$  nM。结果表明,CMD174716对hGPR35和mGPR35受体都具有纳摩尔级的激动活性,因此CMD174716在人源和鼠源的GPR35受体上具有高效的激动活性。

[0019] 实施例2 CMD174716的体外药效评价

[0020] 将大鼠小肠隐窝上皮细胞IEC-6以 $5 \times 10^6$  cells/well接种在24孔板中。12h后使用200 $\mu$ L移液器枪头做划痕,然后加入终浓度1 $\mu$ M、3 $\mu$ M和10 $\mu$ M的CMD174716,6h和24h后用显微镜观察划痕的愈合程度,空白组加入终体积浓度0.1% DMSO的培养,通过ImageJ软件计算伤口修复率,结果如图2,随着浓度的升高,细胞划痕的愈合率增加,CMD174716在10 $\mu$ M时能显著促进划痕伤口的愈合,说明CMD174716能促进上皮细胞的迁移。

[0021] 实施例3 CMD174716的动物药效评价

[0022] 雄性C57BL/6小鼠(6-8周龄)购自上海灵畅生物科技有限公司(中国上海)体重约20g,饲养、繁殖和动物实验均符合《美国国家卫生研究院实验动物的护理和使用指南》,并经上海交通大学生物研究伦理委员会批准。用浓度5%葡聚糖硫酸钠盐(DSS)(5g DSS溶解到100mL的蒸馏水)以饮水方式从第1天开始诱导小鼠实验性结肠炎,共诱导7天。将小鼠随机分为4组(每组n=6,n为小鼠数量),分别为空白组、造模组、低剂量组和高剂量组,其中空白组为饮用未加DSS蒸馏水的小鼠,造模组为饮用含5%DSS蒸馏水的小鼠,CMD174716低剂量组和高剂量组的给药剂量分别为1mg/kg和5mg/kg,给药方式为腹腔注射,低剂量组和高剂量组也饮用含5%DSS的蒸馏水。DSS处理7天后处死小鼠,分析小鼠的活动疾病指数

(DAI)、结肠长度及病理评分,结果见图3,从图3中可以看出CMD174716能呈剂量依赖的降低活动疾病指数(DAI),抑制DSS诱导结肠变短的效应,减小炎症细胞的浸润,表明CMD174716具有防治炎症性肠病的药效。

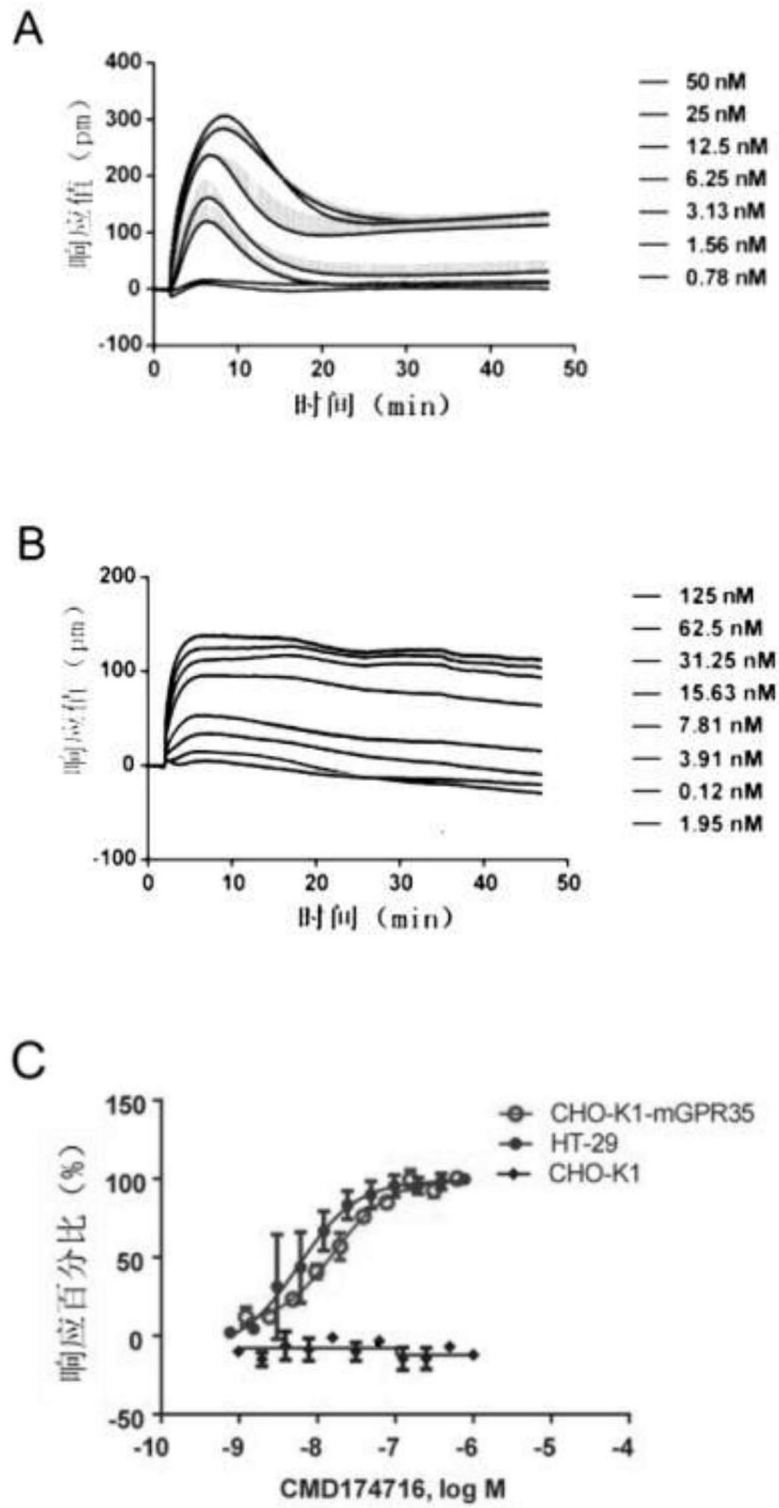


图1

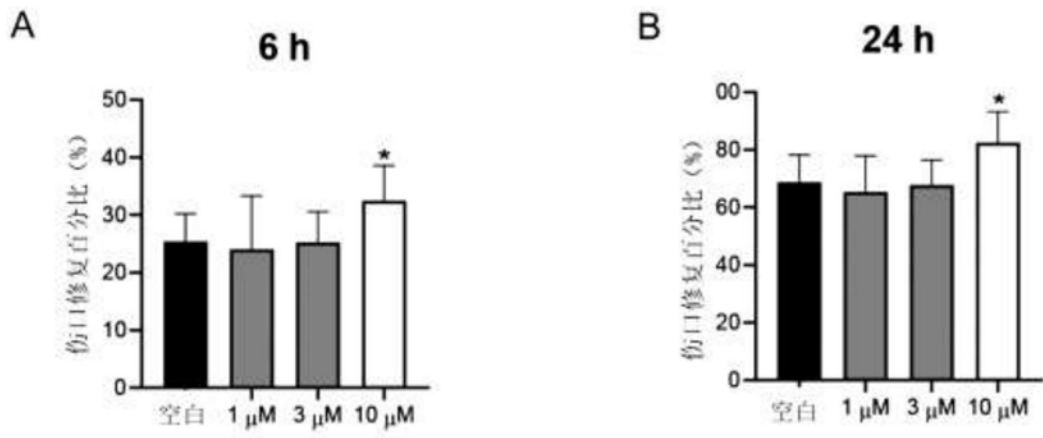


图2

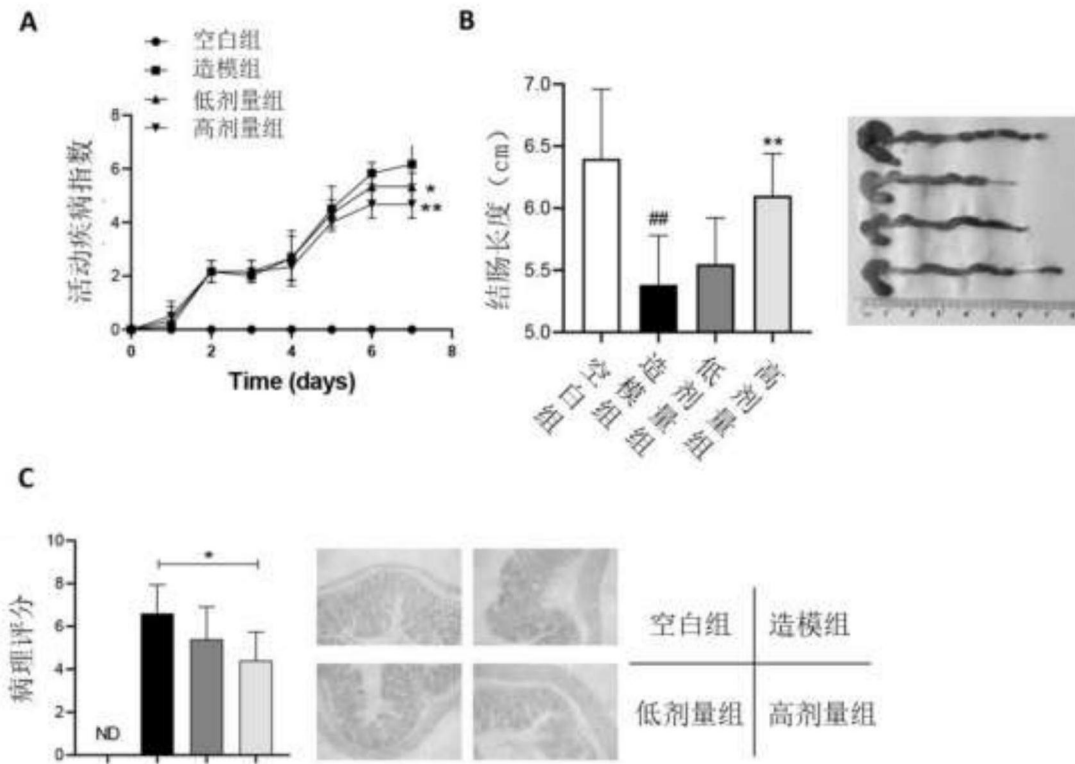


图3