



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115974763 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 18

(21) 申请号 202211671710.8

A61P 17/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.12.26

A61Q 19/02 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

(71) 申请人 常州大学

地址 213164 江苏省常州市武进区滆湖中路21号

(72) 发明人 吕金鹏 张锡梅 高榕荫 曹妍 孟朵 邹坤

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

专利代理师 董建林

(51) Int. Cl.

C07D 209/86 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 417/06 (2006.01)

C07D 403/06 (2006.01)

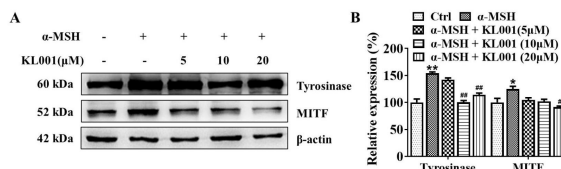
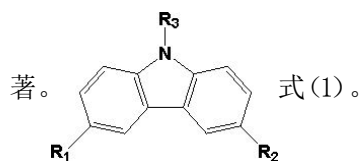
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

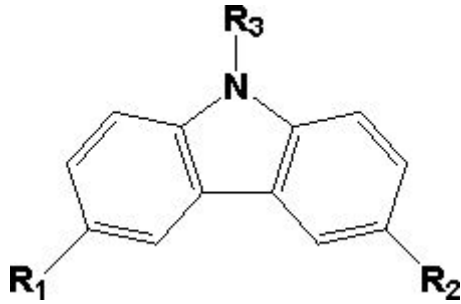
一种咪唑衍生物及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,公开了一种咪唑衍生物及其应用,咪唑衍生物为式(1)所示的结构式或其盐,应用在雀斑、妊娠斑、黄褐斑、咖啡斑、色痣、紫外线诱导的色素沉着及遗传性黑皮肤的治疗或预防的药物或化妆品中,效果显著。



1. 一种咪唑衍生物,其特征在于,为式(1)结构式或其盐:



式(1),

其中,R₁为H或F,R₂为H或F,R₃为N-咪唑-2-基甲基-N-(2-羟基丙基)-甲磺酰胺、N-(2-氯-6-氰基苯基)-乙酰胺、1-(1,1-二氧化-异噻唑啉-2-基)-2-丙醇、1-(2-羟基丙基)-咪唑啉-2-酮中的任意一种。

2. 根据权利要求1所述的一种咪唑衍生物,其特征在于,所述R₁为H,R₂为H,R₃为N-咪唑-2-基甲基-N-(2-羟基丙基)-甲磺酰胺,式(1)为N-(3-咪唑-9-基-2-羟基丙基)-N-咪唑-2-基甲基甲磺酰胺(KL001)。

3. 根据权利要求1所述的一种咪唑衍生物,其特征在于,所述R₁为H,R₂为H,R₃为N-(2-氯-6-氰基苯基)-乙酰胺,式(1)为2-咪唑-9-基-N-(2-氯-6-氰基苯基)-乙酰胺(KL044)。

4. 根据权利要求1所述的一种咪唑衍生物,其特征在于,所述R₁为H,R₂为H,R₃为1-(1,1-二氧化-异噻唑啉-2-基)-2-丙醇,式(1)为1-咪唑-9-基-3-(1,1-二氧化-异噻唑啉-2-基)-2-丙醇。

5. 根据权利要求1所述的一种咪唑衍生物,其特征在于,所述R₁为F、R₂为F,R₃为1-(2-羟基丙基)-咪唑啉-2-酮,式(1)为1-(3-(3,6-二氟-咪唑-9-基)-2-羟基丙基)-咪唑啉-2-酮。

6. 一种化合物,其特征在于,包括权利要求1-5任一所述的一种咪唑衍生物或其光学异构体或其盐,以及药学上可接受的载体或赋形剂。

7. 一种如权利要求1-5任一所述的一种咪唑衍生物的应用,其特征在于,在治疗或预防色素增多性疾病的药物或化妆品中的应用。

8. 根据权利要求7所述的一种咪唑衍生物的应用,其特征在于,所述色素增多性疾病包括雀斑、妊娠斑、黄褐斑、咖啡斑、色痣、紫外线诱导的色素沉着及遗传性黑皮肤。

一种咪唑衍生物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种咪唑衍生物及其应用,具体涉及一种咪唑衍生物及其在治疗或预防色素增多性疾病的药物或化妆品中的应用,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 人类的皮肤、眼睛和头发的颜色均依赖于黑色素的产生,并取决于黑色素的数量、质量和分布。黑色素在保护人类皮肤免受紫外线、以及来自各种环境污染物和有毒化学物质的伤害方面起着关键作用。然而,黑色素的过度产生会导致一些色素沉着疾病,例如雀斑、黄褐斑、炎症后色素沉着,甚至是癌症,因此调节黑色素的形成对控制色素沉着非常重要。

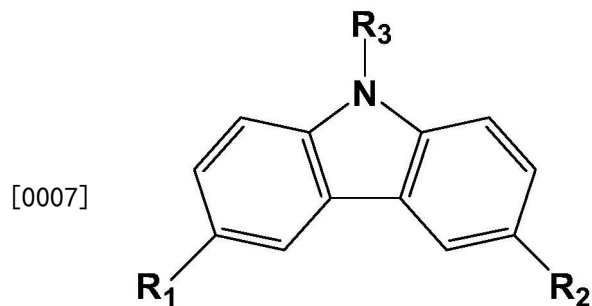
[0003] 在全球范围内,现有技术关于色素代谢障碍相关疾病的治疗选择仍然是一个非常重要但尚未得到充分满足的临床需求。酪氨酸酶(Tyrosinase)是调控黑色素合成的限速酶,抑制酪氨酸酶活性是用来抑制黑色素合成最常用的方法,例如氢醌、熊果苷和曲酸等,已被广泛用作化妆品美白剂。但是上述化合物均存在一定毒副作用,限制了其临床应用。小眼畸形相关转录因子(MITF)是黑色素合成途径中另一个关键调控因子,它不仅可以调节黑色素细胞的增殖和存活,也可以作为转录因子调控酪氨酸酶(Tyrosinase)的表达来促进黑色素合成。例如,异甘草素和橙皮苷可通过加速MITF降解从而抑制黑色素的合成。然而,上述化合物由于生物利用度较差,并没有进行体内研究验证其效果。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有背景技术中的不足,提供一种咪唑衍生物及其应用,提高在治疗或预防色素增多性疾病的药物或化妆品中的应用效果。

[0005] 为达到上述目的,本发明是采用下述技术方案实现的:

[0006] 第一方面,本发明提供一种咪唑衍生物,其特征在于,为式(1)结构式或其盐:



式(1)

[0008] 其中,R₁为H或F,R₂为H或F,R₃为N-咪唑-2-基甲基-N-(2-羟基丙基)-甲磺酰胺、N-(2-氯-6-氰基苯基)-乙酰胺、1-(1,1-二氧化-异噻唑啉-2-基)-2-丙醇、1-(2-羟基丙基)-咪唑啉-2-酮中的任意一种。

[0009] 进一步的,所述R₁为H,R₂为H,R₃为N-咪唑-2-基甲基-N-(2-羟基丙基)-甲磺酰胺,

式(1)为N-(3-咪唑-9-基-2-羟基丙基)-N-呋喃-2-基甲基甲磺酰胺(KL001)。

[0010] 进一步的,所述 R_1 为H, R_2 为H, R_3 为N-(2-氯-6-氰基苯基)-乙酰胺,式(1)为2-咪唑-9-基-N-(2-氯-6-氰基苯基)-乙酰胺(KL044)。

[0011] 进一步的,所述 R_1 为H, R_2 为H, R_3 为1-(1,1-二氧化-异噻唑啉-2-基)-2-丙醇,式(1)为1-咪唑-9-基-3-(1,1-二氧化-异噻唑啉-2-基)-2-丙醇。

[0012] 进一步的,所述 R_1 为F, R_2 为F, R_3 为1-(2-羟基丙基)-咪唑啉-2-酮,式(1)为1-(3-(3,6-二氟-咪唑-9-基)-2-羟基丙基)-咪唑啉-2-酮。

[0013] 第二方面,本发明提供一种化合物,包括上述任一所述的一种咪唑衍生物或其光学异构体或其盐,以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0014] 一种如上述任一所述的一种咪唑衍生物,在治疗或预防色素增多性疾病的药物或化妆品中的应用。

[0015] 进一步的,所述色素增多性疾病包括雀斑、妊娠斑、黄褐斑、咖啡斑、色痣、紫外线诱导的色素沉着及遗传性黑皮肤。

[0016] 与现有技术相比,本发明所达到的有益效果为:

[0017] 本发明提供的咪唑衍生物,应用在治疗或预防色素增多性疾病的药物或化妆品中,显著抑制黑色素合成;

[0018] 经体内药效学试验进一步证明N-(3-咪唑-9-基-2-羟基丙基)-N-呋喃-2-基甲基甲磺酰胺(KL001)可以抑制UVB照射引起的豚鼠背部色素沉着,具有治疗色素增多性疾病的功效,特别是治疗黄褐斑、炎症后色素沉着和老年性雀斑。

附图说明

[0019] 图1是KL001对人原代黑色素细胞中黑色素合成关键蛋白Tyrosinase、MITF表达的影响,其中图A为蛋白免疫印迹图片,图B为蛋白相对表达量;

[0020] 图2是KL044对人原代黑色素细胞中黑色素合成关键蛋白Tyrosinase、MITF表达的影响,其中图A为蛋白免疫印迹图片,图B为蛋白相对表达量;

[0021] 图3是KL001对豚鼠背部皮肤黑色素合成的影响对比图;

[0022] 图4是KL001与对照组随时间的推移对豚鼠背部皮肤影响的色差值图;

[0023] 图5是KL001对豚鼠背部皮肤黑色素合成的影响对比图;

[0024] 图6是KL001对豚鼠背部皮肤黑色素细胞数量的影响对比图。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图对本发明作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0026] 本实施例进行咪唑衍生物对人原代黑素细胞黑色素合成的影响,具体涉及到四种咪唑衍生物(购买自MedChemExpress公司)对人原代黑素细胞增殖的影响,以及对人原代黑素细胞黑色素合成的影响。

[0027] 实施例一

[0028] 一、咪唑衍生物对人原代黑素细胞增殖的影响,具体实验过程如下:

[0029] 在96孔板加入人原代黑色素细胞100 μ L/孔(约 1×10^4),置37 $^{\circ}$ C 5%CO₂细胞培养箱

培养24小时；

[0030] 分别加入上述四种咪唑类衍生物(20 μ mol/L),在37 $^{\circ}$ C,含5%CO₂空气及100%湿度的细胞培养箱中培养48小时；

[0031] 每孔加50 μ L 1 \times MTT,在37 $^{\circ}$ C孵育4小时,使MTT还原为甲臞；

[0032] 吸出上清液,每孔加150 μ L DMSO使甲臞溶解,用平板摇床摇匀。

[0033] 酶标仪在490nm波长处检测每孔的光密度,计算细胞增殖率,结果见表1。

[0034] 实验结果:与空白对照组相比,给药组对正常人原代黑素细胞生长无显著性影响(P>0.05)。

[0035] 从表1可得出实验结论:四种咪唑衍生物对人原代黑素细胞增殖无显著影响,且显示出较低的毒性。

[0036] 二、咪唑衍生物对人原代黑素细胞黑色素合成的影响,具体实验过程如下:

[0037] 在6孔板加入人原代黑色素细胞2mL/孔(约2 \times 10⁵),置37 $^{\circ}$ C 5%CO₂细胞培养箱培养24小时；

[0038] 分别加入上述四种咪唑类衍生物(20 μ mol/L),在37 $^{\circ}$ C,含5%CO₂空气及100%湿度的细胞培养箱中培养48小时；

[0039] 每孔加入100 μ L非变性裂解液(含1nM PMSF),冰上裂解20分钟,收集上述给药处理后的细胞,4 $^{\circ}$ C,12000r/min离心20分钟,取上清液用BCA法对蛋白进行定量,计算总蛋白含量；

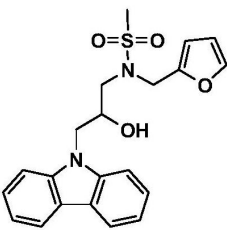
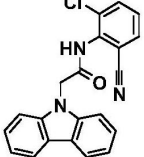
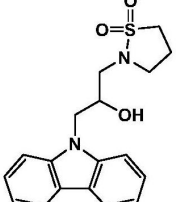
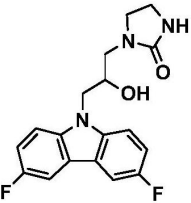
[0040] 下层黑色素沉淀加入100 μ L NaOH溶液(1mol/L,含10%DMSO),置于80 $^{\circ}$ C金属浴中裂解2小时,将溶解完全的黑素以100 μ L/孔加入到96孔板中。

[0041] 酶标仪在405nm波长处检测每孔的光密度,计算细胞增殖率。结果见表1,表1中与空白对照组相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0042] 实验结果:与空白对照组相比,四种咪唑衍生物可以显著抑制人原代黑素细胞的黑色素合成。

[0043] 实验结论:四种咪唑类衍生物均可显著抑制人原代黑色素细胞黑素的合成,其中化合物N-(3-咪唑-9-基-2-羟基丙基)-N-呋喃-2-基甲基甲磺酰胺(KL001)抑制黑色素合成的效果最明显。

[0044] 表1:咪唑衍生物对人原代黑素细胞增殖率及黑色素合成的影响

编号	化合物名称	结构式	细胞增殖率(%)	黑色素合成(%)
1	N-(3-咪唑-9-基-2-羟基丙基)-N-呋喃-2-基甲基甲磺酰胺 (KL001)		97.43 ± 5.24	52.61 ± 4.27***
2	2-咪唑-9-基-N-(2-氯-6-氰基苯基)-乙酰胺 (KL044)		99.14 ± 5.67	68.19 ± 5.49**
3	1-咪唑-9-基-3-(1,1-二氧化-异噻唑啉-2-基)-2-丙醇		101.43 ± 4.13	70.52 ± 6.81*
4	1-(3-(3,6-二氟-咪唑-9-基)-2-羟基丙基)-咪唑啉-2-酮		92.19 ± 6.92	76.62 ± 4.19*

[0046] 实施例二

[0047] 本实施例进行KL001、KL044对人原代黑素细胞中黑素合成重要调控蛋白Tyrosinase、MITF表达的影响,具体过程如下:

[0048] 在6孔板加入人原代黑色素细胞2mL/孔(约 2×10^5),置37°C 5%CO₂细胞培养箱培养24小时;

[0049] 应用 α -MSH处理黑色素细胞,之后加入不同浓度KL001或者KL044,在37°C,含5%CO₂空气及100%湿度的细胞培养箱中培养48小时;

[0050] 每孔加入100 μ L非变性裂解液(含1nM PMSF),冰上裂解20分钟,收集上述给药处理后的细胞,4°C,12000r/min离心20分钟,取上清液用BCA法对蛋白进行定量,计算总蛋白含量;

[0051] 调整蛋白裂解液到相同浓度,与等体积的2倍上样缓冲液混匀,煮沸10分钟后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;

[0052] 电泳完毕后,用100V电压转移1小时将蛋白转至PVDF膜上,用含5%脱脂牛奶的TBST(0.05%Tween-20)封闭1.5小时;

[0053] 将膜分别与溶于TBST中的MITF、Tyrosinase、 β -actin一抗(1:1000)4°C孵育过夜, TBST洗4次,每次7分钟,后加入HRP标记的二抗体以结合一抗,室温孵育膜1小时;取出膜, TBST洗4次,每次7分钟。

[0054] 化学发光法检测,将预先混合好的发光液滴加到膜上,用凝胶成像系统拍照成像。并采用Bio-Rad公司Quantity one软件分析结果。如附图1所示,为KL001对人原代黑色素细

胞中黑色素合成关键蛋白Tyrosinase、MITF表达的影响,附图2是KL044对人原代黑色素细胞中黑色素合成关键蛋白Tyrosinase、MITF表达的影响,从附图1、2可知:与 α -MSH阳性对照组相比,KL001、KL044可显著抑制人原代黑色素细胞中MITF、Tyrosinase的蛋白表达,差异具显著性($^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$)

[0055] 实验结论:KL001、KL044可通过抑制人原代黑色素细胞中黑素合成重要蛋白(MITF、Tyrosinase)的表达而抑制黑色素合成。

[0056] 实施例三

[0057] 本实施例进行KL001对紫外线诱导的豚鼠背部色素沉着的影响实验,具体操作过程如下:

[0058] 豚鼠适应性饲养后(10只,雌雄各半),用电动剃须刀剃尽豚鼠背部的毛,用紫外线光疗仪(希格玛,SH4B)照射豚鼠背部皮肤,总面积为 $6*6\text{cm}^2$ 。

[0059] 灯管距豚鼠背部距离15cm,一次性照射剂量为 $500\text{mJ}/\text{cm}^2$,连续一周处理。

[0060] 豚鼠背部皮肤照光后一周,局部形成稳定的色素沉着,将照光区分为两处用药区,一处涂抹KL001(1.5%),一处涂抹空白基质,每处用药面积为1cm直径的圆,两处用药区间隔0.5cm,每日涂药两次。

[0061] 持续三周,用药前用电动剃须刀剃尽短毛。分别在紫外线照射前、照射后1周、用药后1周、2周、3周时用色彩色差仪(三恩时,CR-400)测量豚鼠背部皮肤各部分的颜色变化,色差值=每次测量值-紫外线照射前的测量值,并拍摄照片以便进行客观比较。

[0062] 四周之后,取皮肤组织,4%的多聚甲醛溶液固定,常规石蜡切片。

[0063] Masson-Fontana胺银染色法测定豚鼠背部皮肤黑色素的变化,免疫组化S-100检测背部皮肤黑色素细胞数目的变化。结果见图3,图4,图5,图6所示,图4中KL001与对照组相比, $^*P<0.05$ 。从图3-图6可得与空白对照组相比,KL001抑制紫外线诱导的豚鼠背部皮肤中黑色素的合成,并且对皮肤中黑色素细胞数目无明显的影响。

[0064] 本实施例可得出实验结论:KL001减少紫外线诱导的豚鼠背部皮肤的黑色素沉着。

[0065] 本发明提供了一种咪唑生物或其药学上可接受的盐在制备治疗和/或预防色素增多性疾病的药物/化妆品的用途,特别是制备治疗和/或预防雀斑、妊娠斑、黄褐斑、咖啡斑、色痣、紫外线诱导的色素沉着、遗传性黑皮肤的药物/化妆品的用途。

[0066] 体外实验证明上述四种咪唑衍生物可显著抑制黑色素合成;体内药效学试验进一步证明N-(3-咪唑-9-基-2-羟基丙基)-N-咪喃-2-基甲基甲磺酰胺(KL001)可以抑制UVB照射引起的豚鼠背部色素沉着,具有治疗色素增多性疾病的功效,特别是治疗黄褐斑、炎症后色素沉着和老年性雀斑。

[0067] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变形,这些改进和变形也应视为本发明的保护范围。

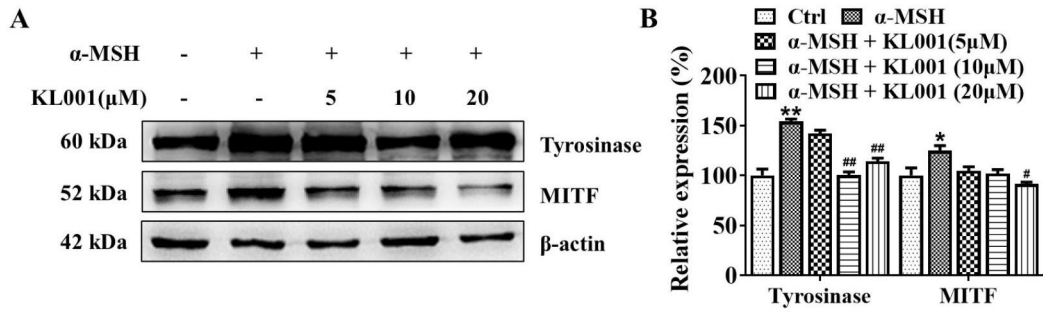


图1

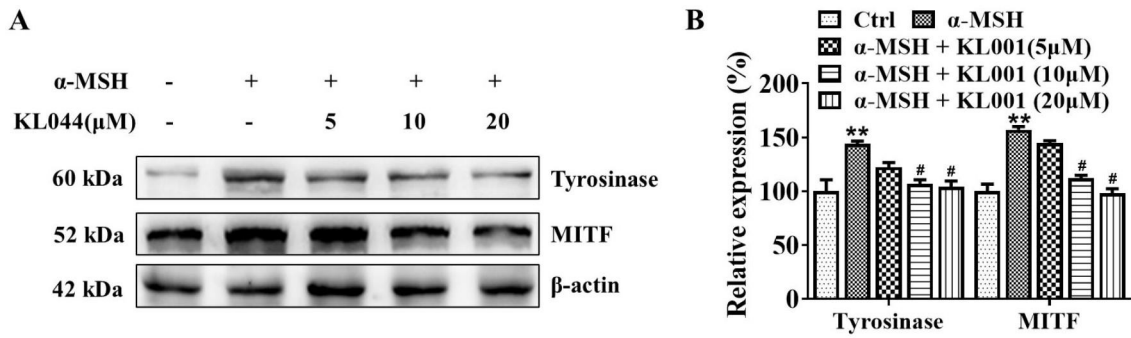


图2

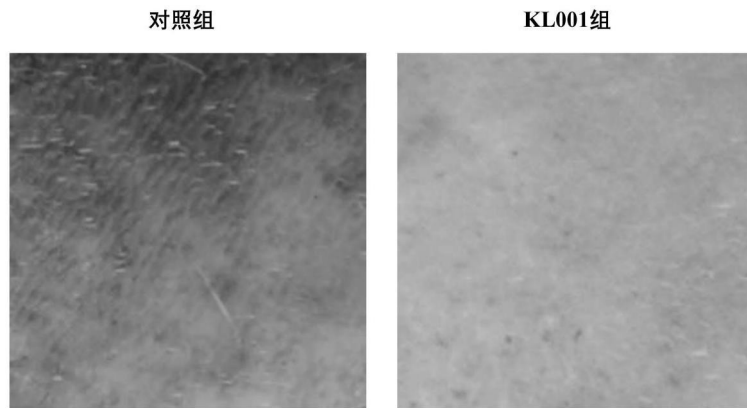


图3

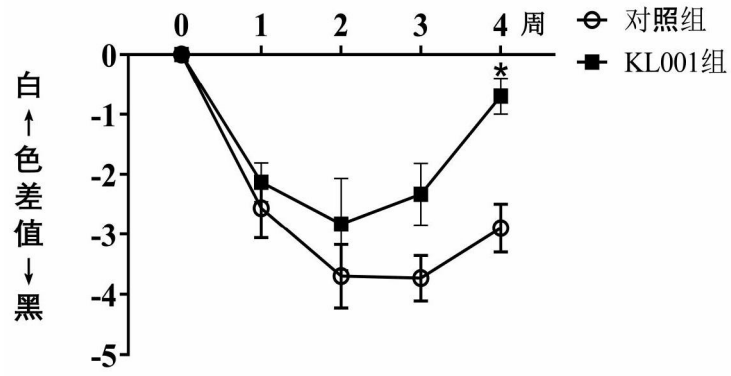


图4

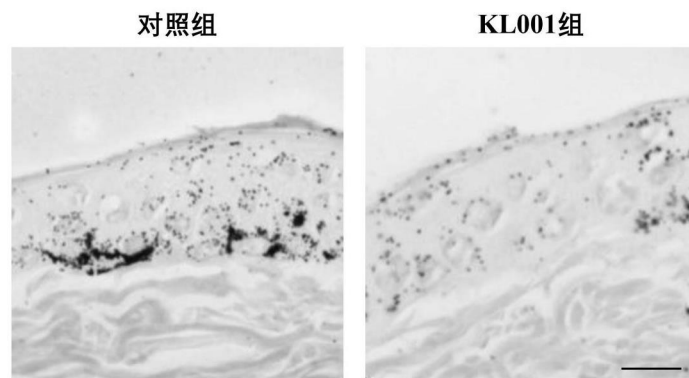


图5

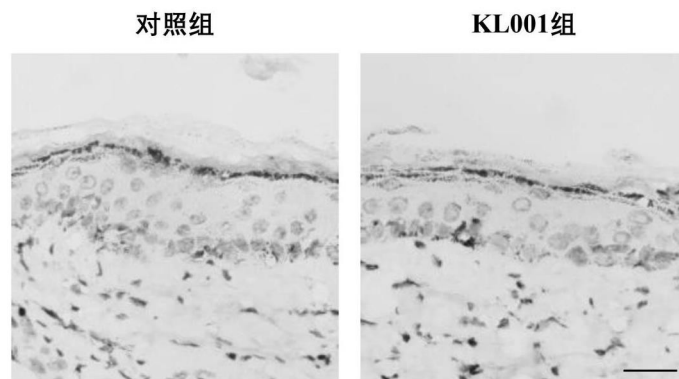


图6