



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105037476 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510431230. 8

A61P 13/12(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 07. 30

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 37/00(2006. 01)

08013676. 5 2008. 07. 30 EP

(62) 分案原申请数据

200980138550. 7 2009. 07. 30

(71) 申请人 英特塞普特医药品公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 R. 佩里恰里

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 常雨轩 郑霞

(51) Int. Cl.

C07J 31/00(2006. 01)

A61K 31/575(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

A61P 1/16(2006. 01)

A61P 3/00(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

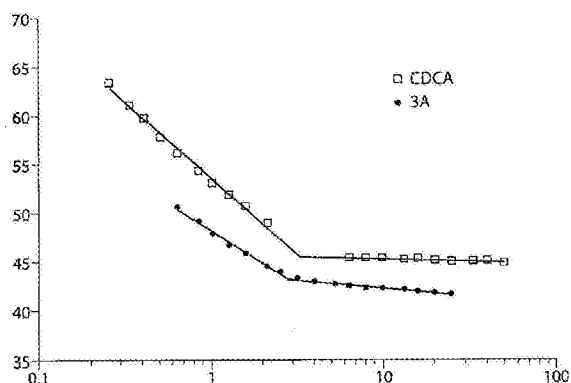
权利要求书4页 说明书42页 附图8页

(54) 发明名称

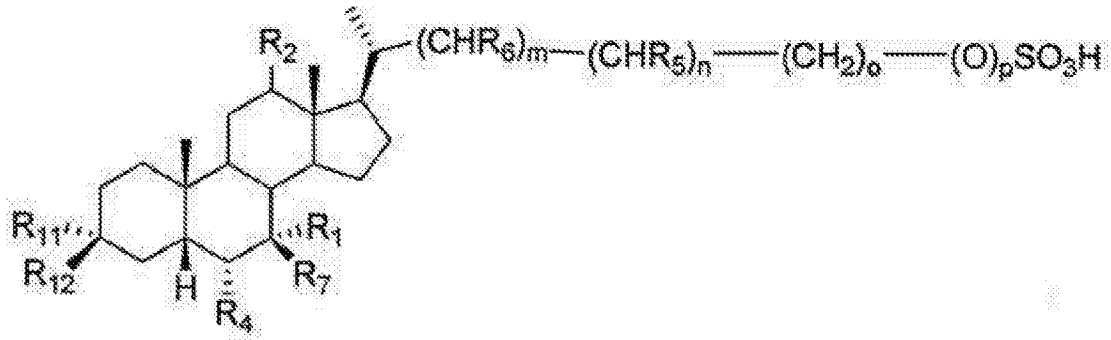
TGR5 调节剂及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及通式 A 的化合物 : (A) 或其盐、溶剂化物、或氢氧化物。通式 A 的化合物是对疾病治疗有帮助的 TGR5 调节剂。



1. 一种具有通式 A 的化合物：



或者其盐、溶剂化物、或者水合物，其中：

R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素；

R_2 为氢或 α -羟基；

R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素；

R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基；

R_6 为氢、未取代的或取代的烷基，或者 R_5 和 R_6 与它们连接的碳原子一起形成尺寸为 3、4、5、或 6 个原子的环；

R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基；

R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢；

R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基；

m 为 0、1 或者 2；

n 为 0 或者 1；

o 为 0 或者 1；

p 为 0 或者 1；条件是

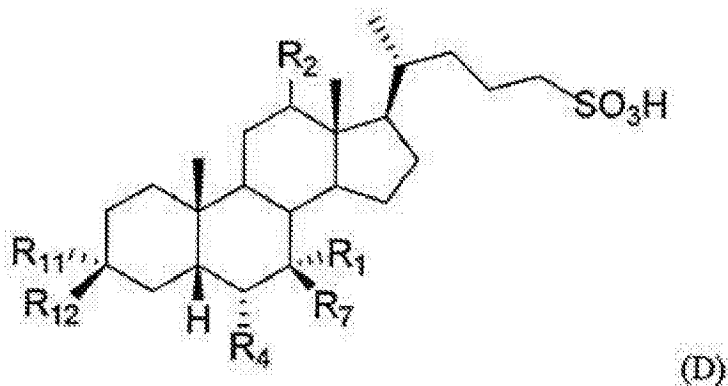
当 $m + n + o = 3$ 或者 4 时， p 为 0，且 R_5 为氢，然后 R_4 不为氢，除非 R_7 为 OH；

当 $m + n + o = 3$ ， p 为 1，并且 R_5 和 R_6 彼此都为氢，然后 R_2 和 R_4 中至少一个不为氢；

和

当 $m + n + o = 2$ 时，然后 R_5 和 R_6 中至少一个不为氢。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，具有通式 D：



或者其盐、溶剂化物、或者水合物，其中

R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素；

R_2 为氢或 α -羟基；

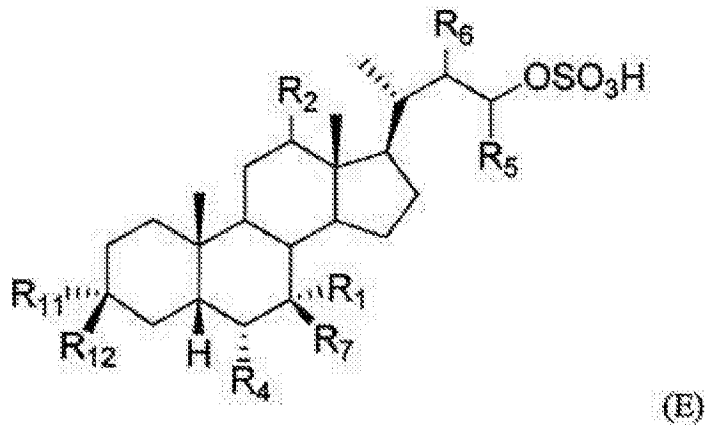
R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素；

R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基；

R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢；和

R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基，条件是 R_4 不为氢，除非 R_7 为 OH 。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物，具有通式 E：



或者其盐、溶剂化物、或者水合物共轭，其中：

R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素；

R_2 为氢或 α -羟基；

R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素；

R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基；

R_6 为氢、未取代的或取代的烷基，或者 R_5 和 R_6 与它们连接的碳原子一起形成尺寸为 3、4、5、或 6 个原子的环；

R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基；

R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢；

R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基；但是 R_5 或者 R_6 中的至少一个不为氢。

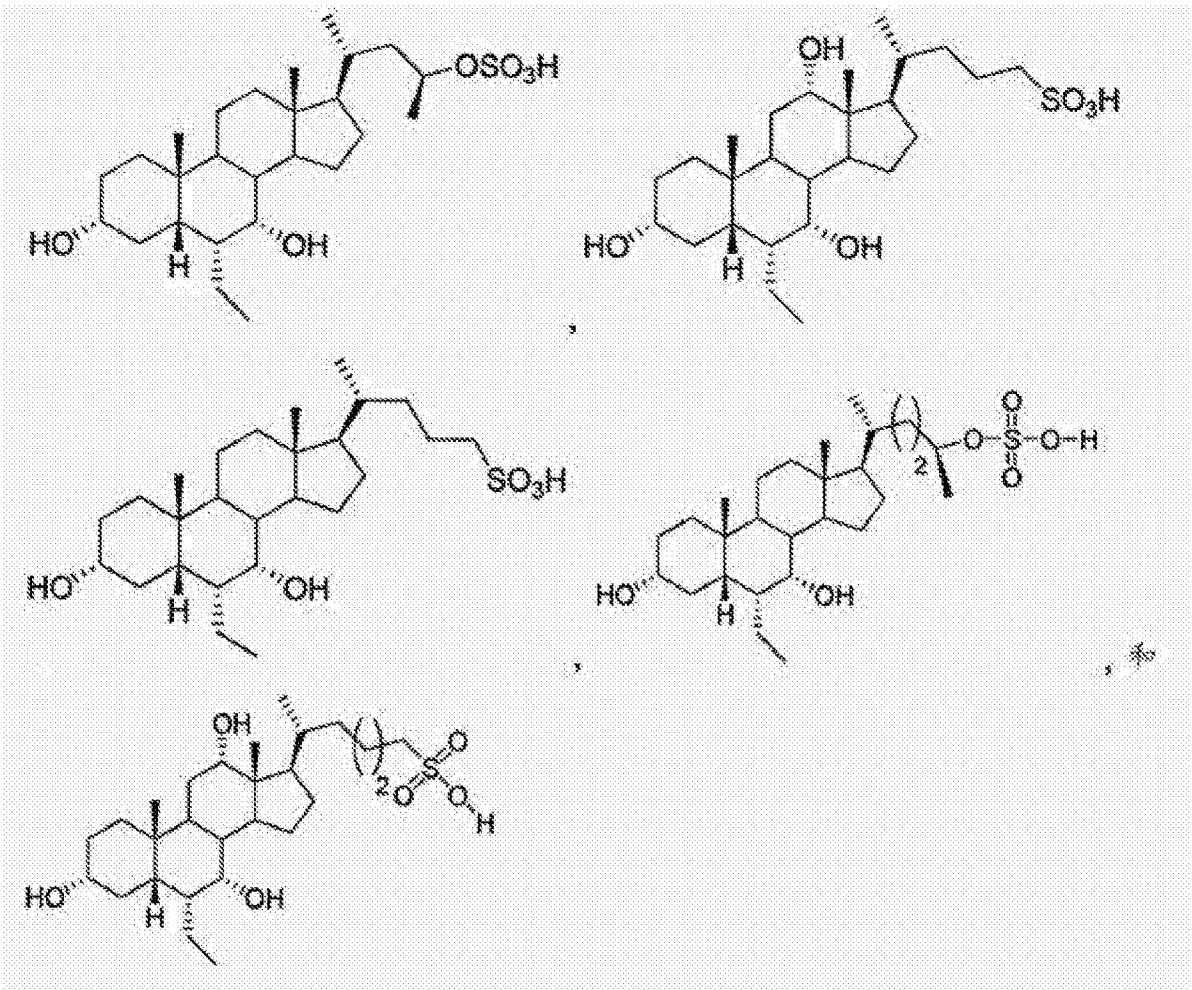
4. 根据权利要求 1-3 中任一权利要求所述的化合物或者其盐、溶剂化物、或者水合物，其中 R_1 为羟基。

5. 根据权利要求 1-4 中任一权利要求所述的化合物或者其盐、溶剂化物、或者水合物，其中 R_7 为氢。

6. 根据权利要求 1-5 中任一权利要求所述的化合物或者其盐、溶剂化物、或者水合物，其中 R_2 为氢。

7. 根据权利要求 1-6 中任一权利要求所述的化合物或者其盐、溶剂化物、或者水合物，其中 R_4 是未取代的烷基。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物，选自下列通式

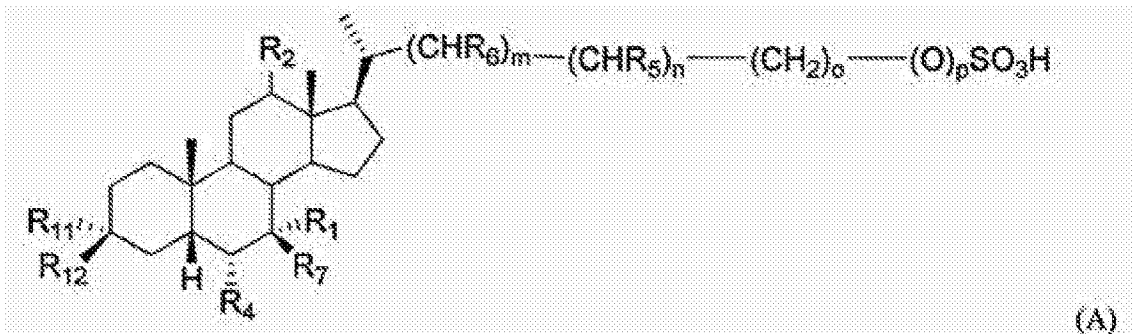


或者其盐、溶剂化物、或水合物。

9. 根据权利要求 1-8 中任一权利要求所述的化合物, 其中化合物是制药用盐。

10. 一种包括权利要求 1-9 中任一权利要求所述的化合物和至少一个制药用赋形剂的药物组合物。

11. 具有通式 A 的化合物或者其盐、溶剂化物、或水合物, 或者包括具有通式 A 的化合物或其盐、溶剂化物、或水合物的药物组合物在制备用于治疗或预防主体涉及 TGR5 受体的调节的疾病的药剂中的应用:



其中:

R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素;

R_2 为氢或 α -羟基;

R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素;

R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基；

R_6 为氢、未取代的或取代的烷基，或者 R_5 和 R_6 与它们连接的碳原子一起形成尺寸为 3、4、5、或 6 个原子的环；

R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基；

R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢；

R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基；

m 为 0、1 或者 2；

n 为 0 或者 1；

o 为 0 或者 1；

p 为 0 或者 1。

12. 根据权利要求 11 所述的应用，其中疾病选自代谢疾病、炎症、肝病、自身免疫性疾病、心脏病、肾病、癌症和胃肠疾病。

13. 根据权利要求 12 所述的应用，其中疾病选自炎症和癌症。

14. 根据权利要求 11-13 中任一权利要求所述的应用，其中该化合物或药物组合物对主体口服给药、肠胃外给药、静脉注射给药、或者局部给药。

15. 根据权利要求 11-14 中任一权利要求所述的应用，其中主体是人。

TGR5 调节剂及其使用方法

[0001] 本申请是申请日 2009 年 7 月 30 日、申请号 200980138550.7、发明名称“TGR5 调节剂及其使用方法”的中国专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及调节 TGR5 的包含硫酸盐或者磺酸基的化合物,以及包含在疾病治疗和预防的方法中有帮助的该化合物的药物组合物。

背景技术

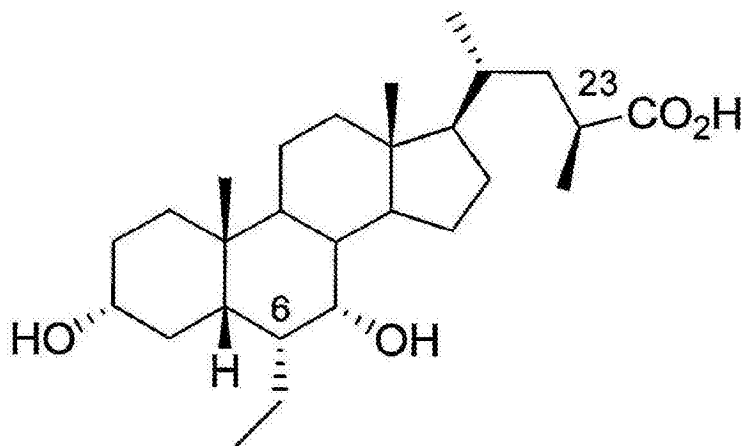
[0003] TGR5 受体是一种 G-蛋白偶联受体,确定为一种应答胆汁酸 (BAs) 的细胞表面受体。TGR5 的主体结构和其胆汁酸应答被发现高度保存在人、牛、兔子、老鼠和小鼠的 TGR5 内,因此,暗示着 TGR5 具有重要的生理功能。TGR5 也被发现不仅广泛分布在淋巴组织内,也在其他组织内。高水平的 TGR5 mRNA 也在胎盘、脾、和单核 / 巨噬细胞内检测到。胆汁酸已证实促使 TGR5 融合蛋白从细胞膜到细胞质的内在化。Kawamata 等人 2003, J. Bio. Chem., 278, 9435。TGR5 被发现与 Takeda 等人 2002, FEBS Lett. 520, 97-101 中报道的 hGPCR19 的具有相同性。

[0004] TGR5 与 cAMP 的胞内积累有关,广泛存在于不同细胞类型内。当巨噬细胞膜受体活化时,降低促炎细胞因子的产生, (Kawamata, Y. ;Fujii, R. ;Hosoya, M. ;Harada, M. ;Yoshida, H. ;Miwa, M. ;Fukusumi, S. ;Habata, Y. ;Itoh, T. ;Shintani, Y. ;Hinuma, S. ;Fujisawa, Y. ;Fujino, M., A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. J. Biol. Chem. 2003, 278, 9435-9440), 脂肪细胞和肌细胞内的胆汁酸刺激 TGR5 提高能量消耗 (Watanabe, M. ;Houten, S. M. ;Mataki, C ;Christoffolete, M. A. ;Kim, B. W. ;Sato, H. ;Messaddeq, N. ;Harney, J. W. ;Ezaki, O. ;Kodama, T. ;Schoonjans, K. ;Bianco, A. C ;Auwerx, J., Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. Nature. 2006, 439, 484-489)。后者的影响涉及依赖 cAMP 的 2 型碘甲状腺原氨酸脱碘酶 (D2) 诱导,通过局部将 T4 转变成 T3,促使提高甲状腺激素活性。能量代谢控制中 TGR5 作用一致,当配给高脂肪饮食时,雌性 TGR5 基因敲除小鼠显示出显著的体重增加脂肪积累, TGR5 缺少降低了能量代谢并引起肥胖。(Maruyama, T. ;Tanaka, K. ;Suzuki, J. ;Miyoshi, H. ;Harada, N. ;Nakamura, T. ;Miyamoto, Y. ;Kanatani, A. ;Tamai, Y., Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/MBar) in mice. J. Endocrinol. 2006, 191, 197-205)。此外,符合能量平衡中 TGR5 的参与,膜受体的胆汁酸激活也被报道促使大鼠内分泌细胞株胰高血糖素样肽 1 (GLP-I) 的产生 (Katsuma, S. ;Hirasawa, A. ;Tsujiyama, G., Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 329, 386-390)。基于所有上述观察, TGR5 是疾病治疗的新途径。

[0005] 到目前为止,文献中描述了 TGR5 激动剂的几个实施例。最近,鹅脱氧胆酸的 23-烷基-取代和 6,23-烷基-双取代的衍生物,例如如下所示的 6 α -乙基-23(S)-甲

基-鹅脱氧胆酸,被报道为 TGR5 的有效的和具有选择性的激动剂 (Pellicciari, R. ; Sato, H. ;Gioiello, A. ;Costantino, G. ;Macchiarulo, A. ;Sadeghpour, B.M. ;Giorgi, G. ;Schoonjans, K. ;Auwerx, J., Nongenomic actions of bile acids.Synthesis and preliminary characterization of 23-and6,23-alkyl-substituted bile acid derivatives as selective modulators for the g-protein coupled receptor TGR5. J. Med. Chem. 2007,50,4265-4268)。

[0006]



[0007] 尤其,天然胆汁酸的 C23-(S) 位甲基化赋予 TGR5 超过 FXR 活化作用的显著的选择性 (法尼酯 X 受体),然而 6 α -烷基取代物提高了两种受体的功效。其他的 TGR5 激动剂包括 6-甲基-2-氧代-4-噻吩-2-基-1,2,3,4-四氢-嘧啶-5-羧酸苄酯 (W0004067008, Takeda Chemical Industries LTD, Japan,2004) 和齐墩果酸。(Sato, H. ;Genet, C ;Strehle, A. ;Thomas, C ;Lobstein, A. ;Wagner, A. ;Mioskowski, C ;Auwerx, J. ;Saladin, R., Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2007,362,793-798 ;Ito, F. ;Hinuma, K. ;Kanzaki, N. ;Miki, T. ;Kawamata, Y. ;Oi, S. ;Tawaeaiishi, T. ;Ishichi, Y. ;Hirohashi, M. Preparation of aromatic ring-fused cyclic compounds as TGR5 receptor agonists. PN : W02004067008, 2004)。最近,映体鹅脱氧胆酸 (CDCA) 和石胆酸 (LCA) 的首次合成已经进行评估天然胆汁酸与 TGR5 相互作用的特异性 (Katona, B. W. ;Cummins, C. L. ;Ferguson, A. D. ;Li, T. ;Schmidt, D. R. ;Mangelsdorf, D. J. ;Covey, D. F., Synthesis, Characterization, and Receptor Interaction Profiles of Enantiomeric Bile Acids. J. Med. Chem. 2007, 50, 6048-6058)。

[0008] 当这些化学工具首次提供了胆汁酸基因组与非基因组作用的药理学差异时,其中一些绘出第一构效关系研究,TGR5 内附属结合口袋的存在确定配体选择性中起到关键作用 (Pellicciari, R. ;Sato, H. ;Gioiello, A. ;Costantino, G. ;Macchiarulo, A. ;Sadeghpour, B. M. ;Giorgi, G. ;Schoonjans, K. ;Auwerx, J., Nongenomic actions of bile acids. Synthesis and preliminary characterization of 23 -and 6,23-alkyl-substituted bile acid derivatives as selective modulators for the g-protein coupled receptor TGR5. J. Med. Chem. 2007,50,4265-4268)。这种情况下,更有力和更有选择性的 TGR5 调节剂的有效性对进一步鉴别影响受体活化作用的其他特征和对这种受体生理和药

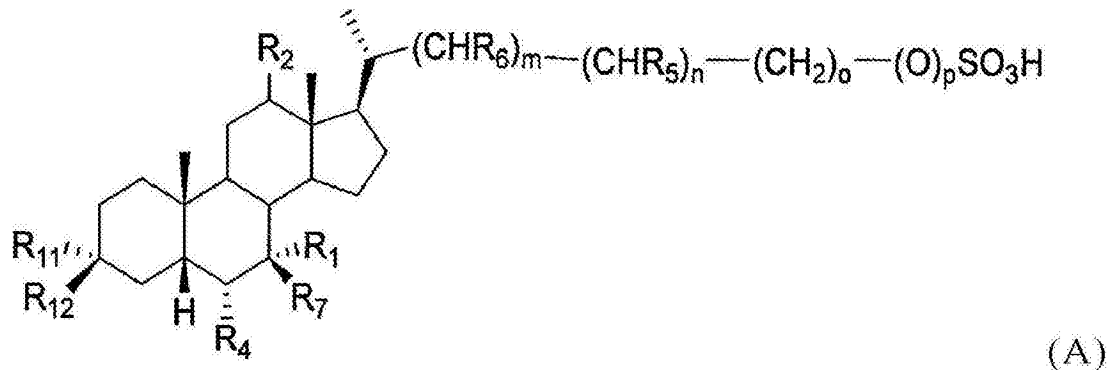
理作用进行表征是有必要的。

[0009] 需要开发出疾病治疗和预防用的 TGR5 调节剂。本发明鉴定出化合物, 化合物包含一种硫酸盐或者磺酸基, 调节 TGR5 以及采用这些化合物治疗疾病的方法。

发明内容

[0010] 本发明涉及包含硫酸盐或者磺酸基的 TGR5 调节剂, 并涉及疾病治疗与预防的使用方法, 该方法涉及调节 TGR5 受体, 疾病如代谢疾病、炎症、肝病、自身免疫性疾病、心脏病、肾病、癌症和胃肠疾病。本发明包括具有通式 A 的化合物:

[0011]



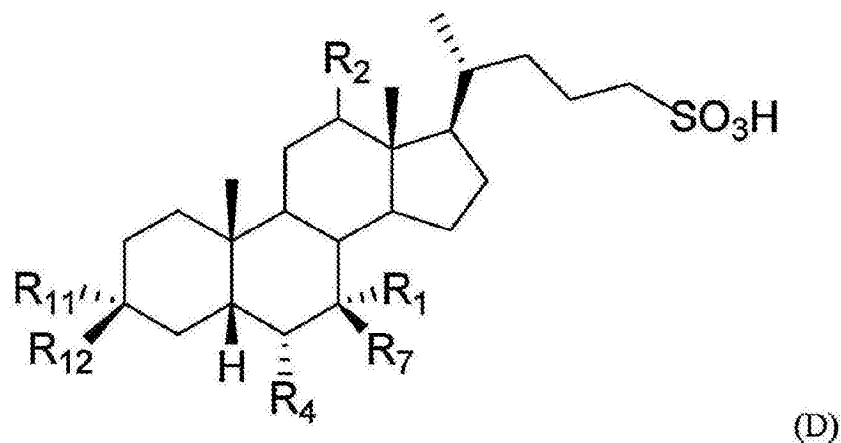
[0012] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物, 其中: R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素; R_2 为氢或者 α -羟基; R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素; R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基; R_6 为氢、未取代的或取代的烷基, 或者 R_5 和 R_6 一起取代碳原子, 它们连接形成一种尺寸为 3、4、5、或 6 个碳原子的环; R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基; R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢; R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢, 或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基;

[0013] m 为 0、1 或者 2; n 为 0 或者 1; o 为 0 或者 1; 并且 p 为 0 或者 1; 但是

[0014] (1) 当 $m+n+o = 3$ 或者 4 时, p 为 0, 如果 R_7 不为 OH, R_5 为氢, 然后 R_4 不为氢; (2) 当 $m+n+o = 3$, p 为 1, 并且 R_5 和 R_6 彼此都为氢, 然后 R_2 和 R_4 中至少一个不为氢; (3) 当 $m+n+o = 2$ 时, 然后 R_5 和 R_6 中至少一个不为氢。

[0015] 一方面, 本发明包括具有通式 D 的化合物:

[0016]

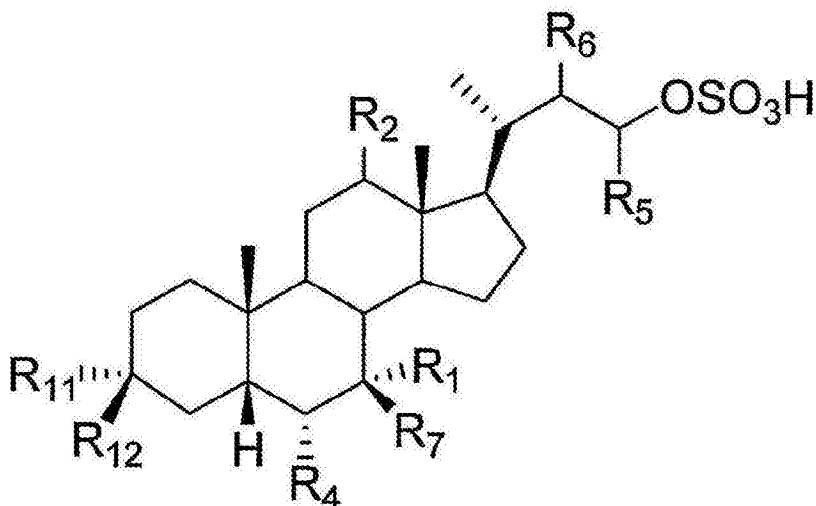


[0017] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物, 其中 R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、

或者卤素； R_2 为氢或者 α -羟基； R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素； R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基； R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢； R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基，但是如果 R_7 不为 OH ， R_4 不为氢。

[0018] 一方面，本发明包括具有下列通式 E 的化合物：

[0019]



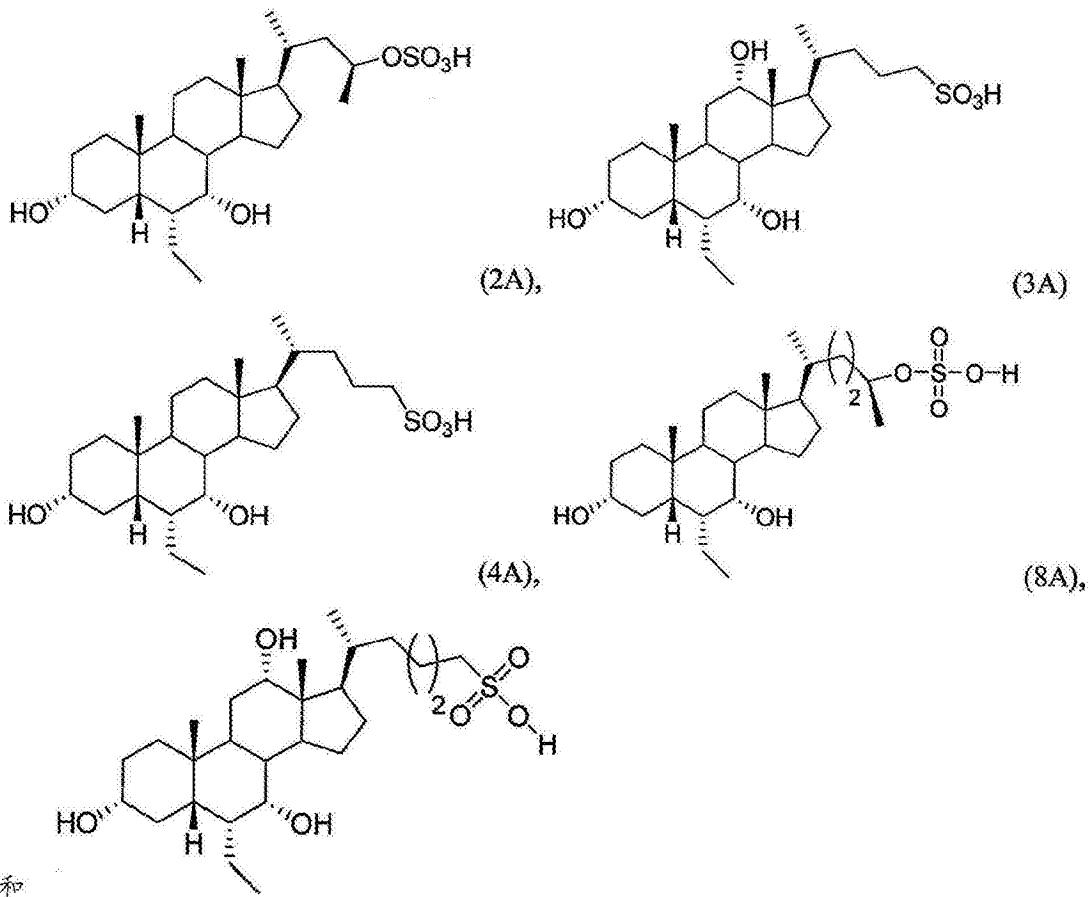
(E)

[0020] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物共轭，其中： R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素； R_2 为氢或者 α -羟基； R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素； R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基； R_6 为氢、未取代的或取代的烷基，或者 R_5 和 R_6 一起取代碳原子，它们连接形成尺寸为 3、4、5、或 6 个碳原子的环； R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基； R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢； R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基；但是 R_5 或者 R_6 中的至少一个不为氢。

[0021] 一方面，本发明包括化合物或者其盐、溶剂化物、或氢氧化物，其中 R_1 为羟基。一方面，本发明包括化合物或者其盐、溶剂化物、或氢氧化物，其中 R_7 为氢。一方面，本发明包括化合物或者其盐、溶剂化物、或氢氧化物，其中 R_2 为氢。一方面，本发明包括化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R_4 为未取代烷基。

[0022] 一方面，本发明包括选自如下通式的化合物或者其盐、溶剂化物、或氢氧化物。

[0023]

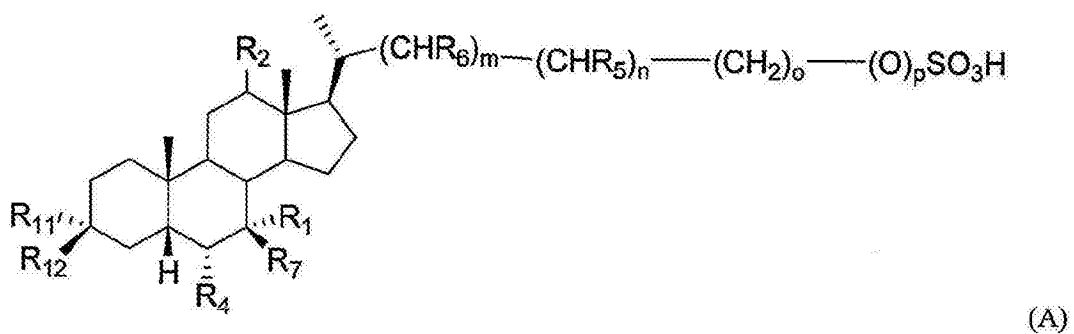


[0024] (9A) 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物。

[0025] 一方面,本发明包括制药用盐的化合物。一方面,本发明包括药物组合物,这种药物组合物包括化合物或者其盐、溶剂化物、或者其氢氧化物和至少一种制药用赋形剂。

[0026] 在另一方面,本发明包括具有通式 A 的化合物或其盐、溶剂化物、或其氢氧化物,或者药物组合物,该药物组合物包括具有通式 A 的化合物或其盐、溶剂化物、或氢氧化物。

[0027]



[0028] 其中：

[0029] R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素； R_2 为氢或者 α -羟基； R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素； R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基； R_6 为氢、未取代的或取代的烷基，或者 R_5 和 R_6 一起取代碳原子，它们连接形成尺寸为 3、4、5、或 6 个碳原子的环； R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基； R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢；

[0030] R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^{2-} 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羧

基 ;m 为 0、1 或者 2 ;n 为 0 或者 1 ;o 为 0 或者 1 ;p 为 0 或者 1 ;治疗或预防主体疾病的药剂制成品中涉及 TGR5 受体的调节。

[0031] 一方面,本发明包括使用方法,其中疾病选自代谢疾病、炎症、肝病、自身免疫性疾病、心脏病、肾病、癌症和胃肠疾病。一方面,本发明包括使用方法,其中疾病选自炎症和癌症。一方面,本发明包括使用方法,其中该化合物或药物组合物对主体口服给药、肠胃外给药、静脉注射给药、或者局部给药。一方面,本发明包括使用方法,其中主体是人。

[0032] 为了下列详细描述可被理解,并且为了本方面对于本领域的贡献可以更好地被理解,上述描述广泛地提出了本发明的更重要特征。本发明的其他目的和特征结合实施例的下列详细描述将变得显而易见。

附图说明

[0033] 图 1 是一条曲线图,描述表面张力与 0.15M 氯化钠中化合物 3A 的浓度 (mM) 的对数的关系。

[0034] 图 2 是一条曲线图,描绘模拟胰液中化合物 2A 的代谢稳定性。

[0035] 图 3 是使用化合物 3A 的十二指肠灌注试验的胆汁流量表。

[0036] 图 4 是使用化合物 3A 的股动脉注射试验的胆汁流量表。

[0037] 图 5 是一个曲线图,描绘使用化合物 3A 的股动脉和十二指肠灌注试验的分泌率与时间的关系。

[0038] 图 6 和图 7 是曲线图,显示质谱仪鉴别十二指肠灌注试验中胆汁内的化合物 3A 和其代谢物。图 7 是图 6 缩放显示图。

[0039] 图 8 是一条曲线图,显示治疗后体重增长的变化 (%) (实施例 11)。

[0040] 图 9 是一系列柱状图,治疗 5 周后身体成分的变化 (%) (实施例 11)。

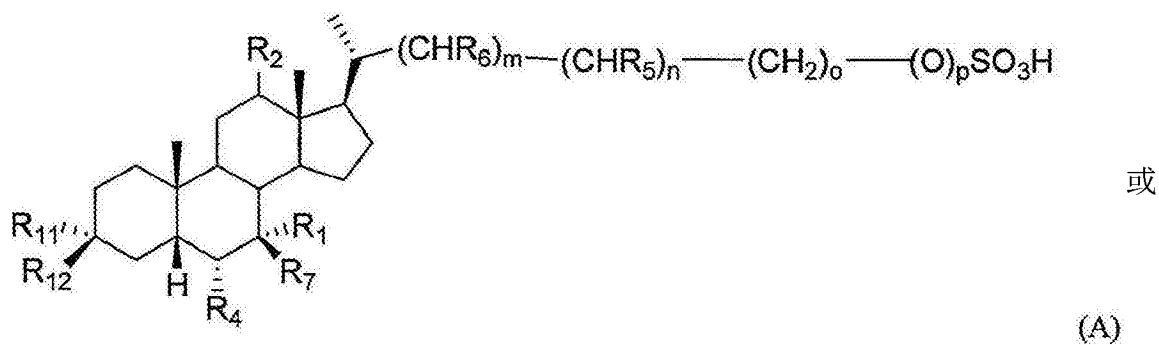
[0041] 图 10 显示化合物 3A 治疗的血糖稳态的评估。图 10A 显示治疗 3 周后血糖过多。图 10B 显示治疗后 3 周血清果糖胺。图 10C 显示治疗后 9 周葡萄糖耐量检测。

具体实施例

[0042] 本发明的一个或多个实施方案的细节在下列附属描述中提出。尽管类似于或等同于本文描述的任何方法和材料可在本发明的实践中或测试中使用,这些方法和材料现在进行描述。本发明的其他特征、目的、和优势从描述中看将是显而易见的。说明书中,除非另外指明,单数形式也包括复数。除非另外指明,本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明归属的领域的技术人员普遍了解的相同意思。冲突情况下,本详述将进行控制。

[0043] 一方面,本发明提供了具有通式 A 的化合物:

[0044]



[0045] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素； R_2 为氢或者 α -羟基； R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素； R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基； R_6 为氢、未取代的或取代的烷基，或者 R_5 和 R_6 一起取代碳原子，它们连接形成尺寸为 3、4、5、或 6 个碳原子的环； R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基； R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢； R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基； m 为 0、1 或者 2； n 为 0 或者 1； o 为 0 或者 1； p 为 0 或者 1。

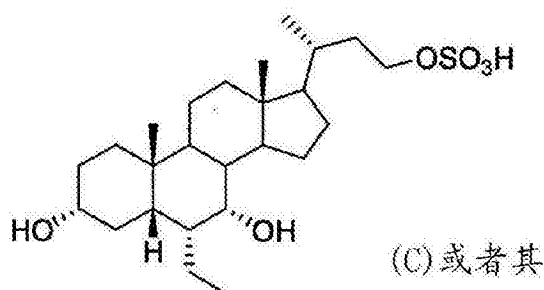
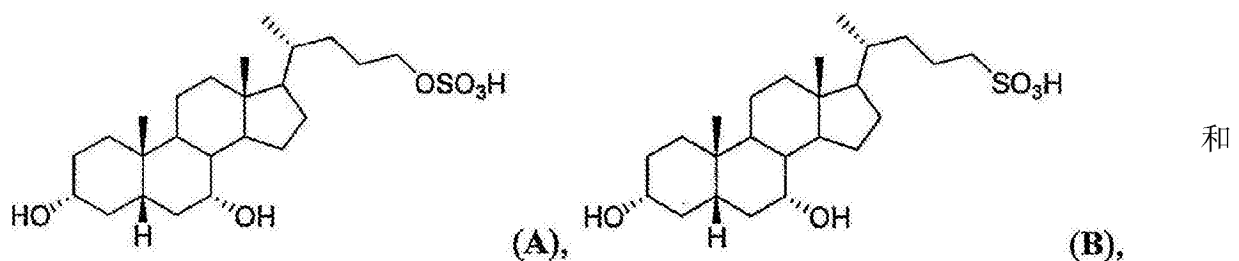
[0046] 一方面，本发明提供，当 $m+n+o = 3$ 或者 4 时， p 为 0，并且除非 R_7 为 OH， R_5 为氢，然后 R_4 不为氢。另一方面，本发明提供，当 $m+n+o = 3$ 或者 4 时， p 为 0，并且除非 R_7 为 OH， R_5 不为取代烷基或芳基， R_4 不为氢。

[0047] 一方面，本发明提供，当 $m+n+o = 3$ 时， p 为 1，并且 R_5 和 R_6 彼此都为氢， R_2 和 R_4 中至少一个不为氢。

[0048] 一方面，本发明提供，当 $m+n+o = 2$ 时， R_5 和 R_6 中至少一个不为氢。

[0049] 一方面，本发明不包括化合物 A、B 和 C：

[0050]

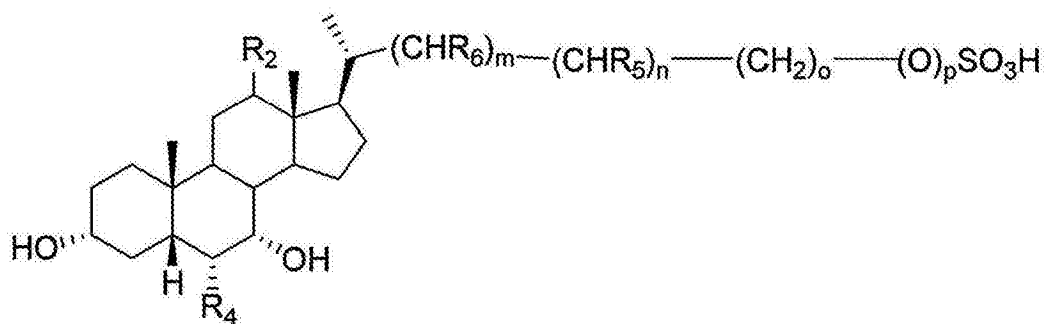


盐、溶剂化物、或者氢氧化物。

[0051] 另一方面，本发明不包括化合物 6A，或其盐、溶剂化物、或氢氧化物。另一方面，本发明不包括化合物 7A 或者其盐、溶剂化物、或氢氧化物。

[0052] 一方面，本发明提供了具有通式 B 的化合物：

[0053]

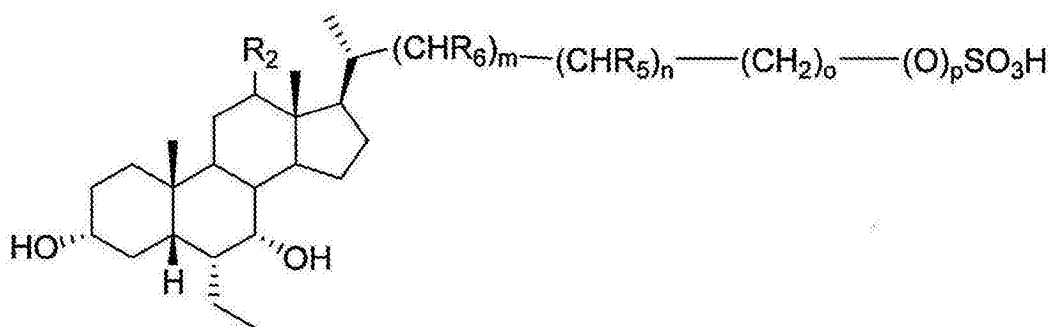


或

[0054] 或者其盐、溶解化物、或氢氧化物，其中 R_2 、 R_4 、 R_5 、和 R_6 、 m 、 n 、 o 、和 p 如上述描述。一方面，本发明提供，当 $m+n+o = 3$ 或者 4 时， p 为 0 ， R_5 为氢， R_4 不为氢。一方面，本发明提供，当 $m+n+o = 3$ 时， p 为 1 ，并且 R_5 和 R_6 彼此都为氢，至少 R_2 和 R_4 中至少一个不为氢。另一方面，本发明提供，当 $m+n+o = 2$ 时， R_5 和 R_6 中至少一个不为氢。

[0055] 一方面，本发明提供了具有通式 C 的化合物：

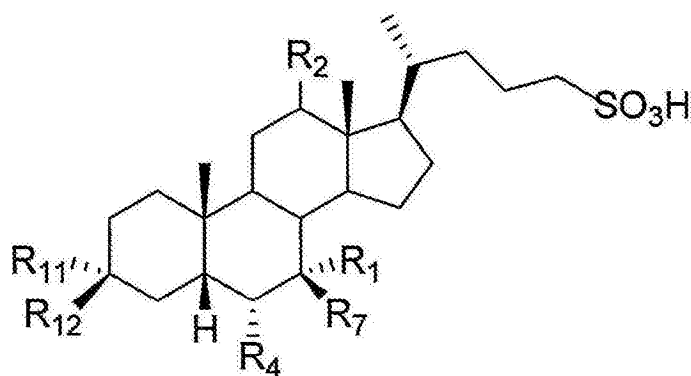
[0056]



[0057] (C) 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R_2 、 R_4 、 R_5 、和 R_6 、 m 、 n 、 o 、和 p 如上述描述。当 $m+n+o = 2$ 时， R_5 和 R_6 中至少一个不为氢。

[0058] 一方面，本发明提供了具有通式 D 的化合物：

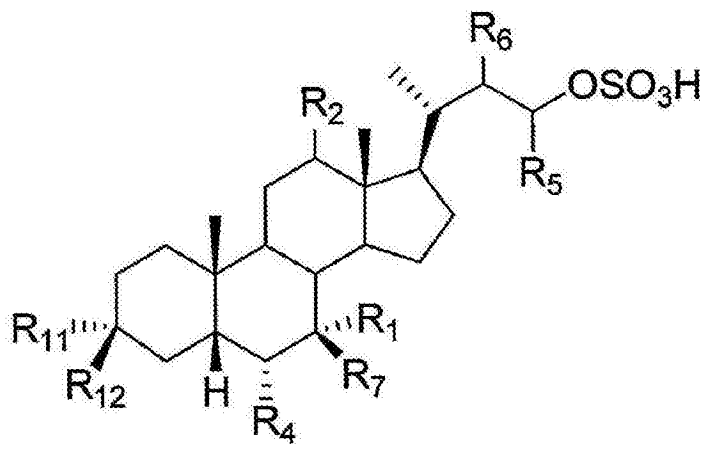
[0059]



[0060] (D) 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 、 R_{11} 、和 R_{12} 如上所述。一方面， R_4 不为氢。

[0061] 一方面，本发明提供具有通式 E 的化合物：

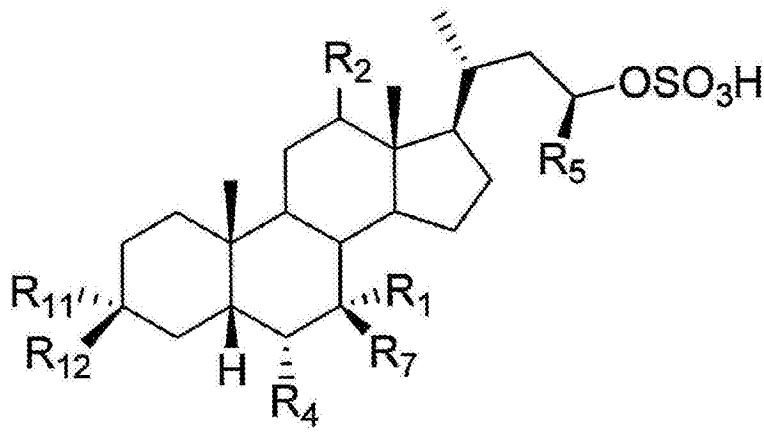
[0062]



[0063] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中： R_1 为氢、羟基、取代的或未取代的烷基、或者卤素； R_2 为氢或者 α -羟基； R_4 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者卤素； R_5 为氢、未取代的烷基、或者芳基； R_6 为氢、未取代的或取代的烷基，或者 R_5 和 R_6 一起取代碳原子，它们连接形成尺寸为3、4、5、或6个碳原子的环； R_7 为氢、取代的或者未取代的烷基、或者羟基； R_{11} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢； R_{12} 为羟基、 OSO_3H 、 OSO_3 、 $OCOCH_3$ 、 OPO_3H 、 OPO_3^2 或者氢，或者 R_{11} 和 R_{12} 一起形成羰基。一方面，本发明提供 R_5 或者 R_6 中至少一个不为氢。

[0064] 一方面，本发明提供具有下列通式F的化合物：

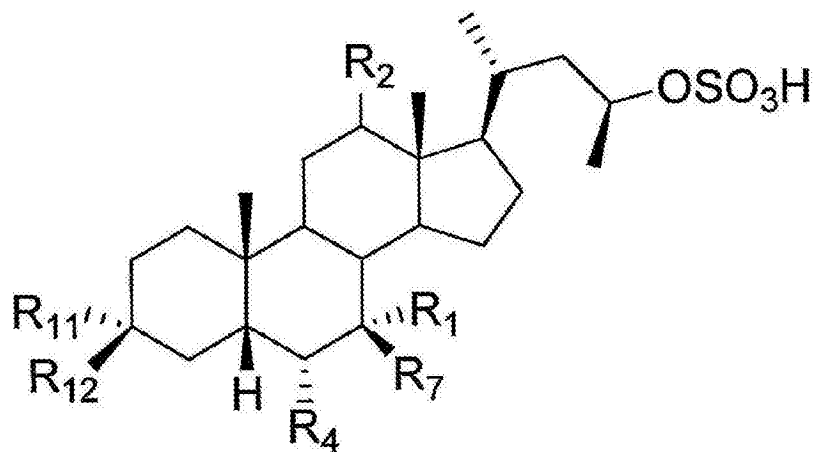
[0065]



[0066] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中： R_5 为未取代的或取代的烷基或芳基； R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 、 R_{11} 、和 R_{12} 如上面所述。

[0067] 一方面，本发明提供具有下列通式G的化合物：

[0068]

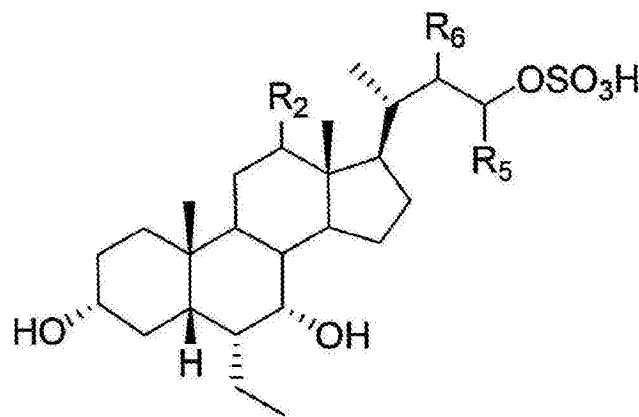


(G)

[0069] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₁、R₂、R₄、R₇、R₁₁、和 R₁₂如上面所述。

[0070] 一方面，本发明提供了具有下列通式 H 的化合物：

[0071]



(H)

[0072] 或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₂、R₅和 R₆如上面所述。

[0073] 一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₁为羟基。

[0074] 一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₁为羟基并且 R₇为氢。

[0075] 一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₂为氢。一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₂为 α-OH。一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₂为 β-OH。

[0076] 一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₄为未取代的烷基。一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₄为乙基。一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₄为甲基。

[0077] 一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₅不为氢。一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₅为未取代的烷基。一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₅为甲基。

[0078] 一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₆为羟基。

[0079] 一方面，本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物，其中 R₅和 R₆都为羟基。

[0080] 一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 R_{11} 为羟基。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 R_{12} 为氢。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 R_{11} 为羟基并且 R_{12} 为氢。

[0081] 一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 m 为 1。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 m 为 2。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 n 为 1。

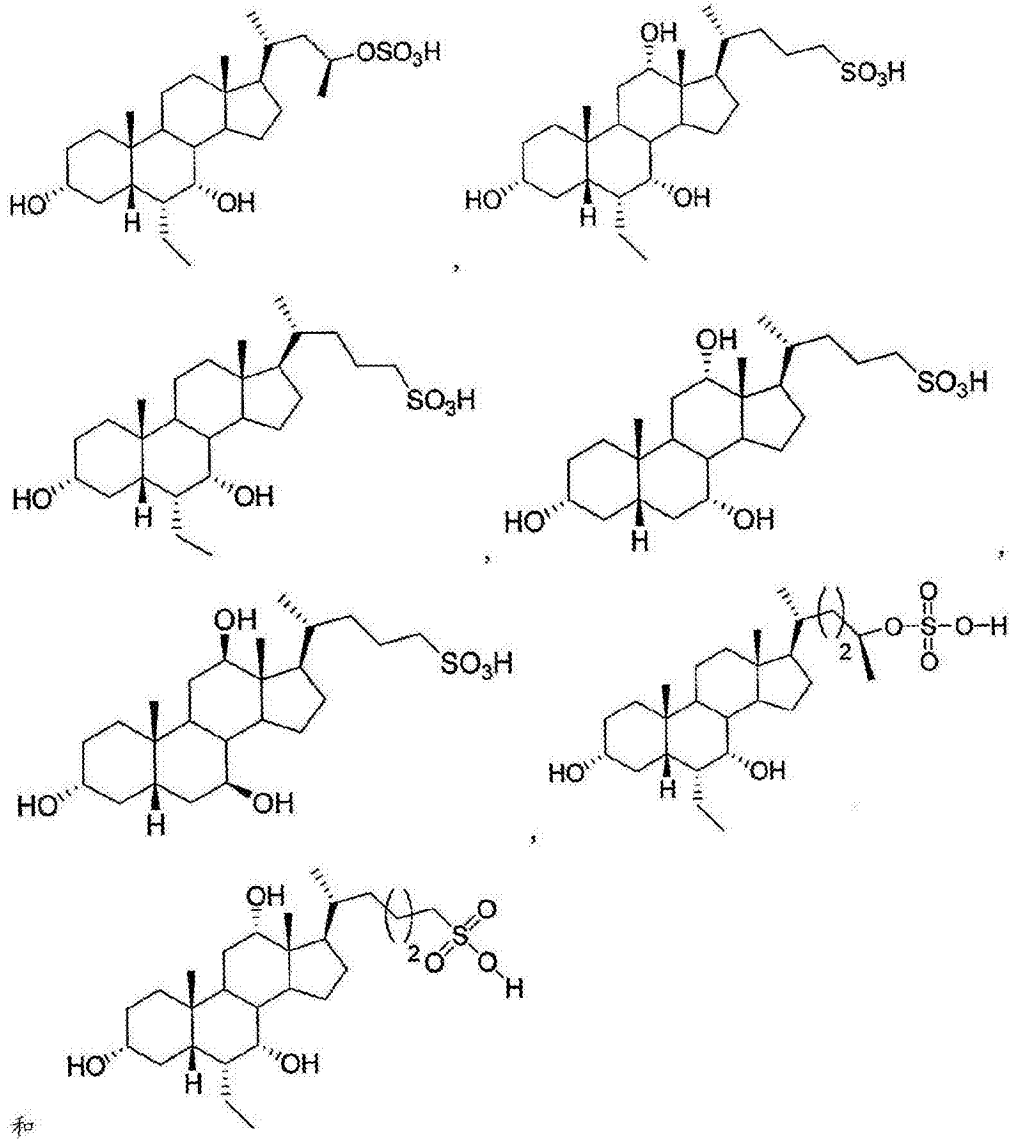
[0082] 一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 o 为 0。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 o 为 1。

[0083] 一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 p 为 1。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 p 为 0。

[0084] 一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 R_4 为乙基并且 p 为 1。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 R_4 为乙基并且化合物包含一种磺酸基。一方面,本发明提供了化合物或者其盐、溶剂化物、或者氢氧化物,其中 R_4 为氢或者取代的或者未取代的烷基并且 p 为 0。

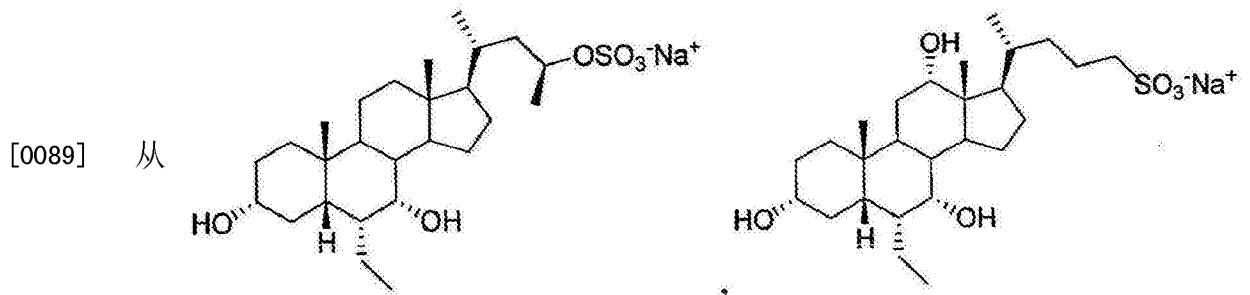
[0085] 一方面,本发明提供了选自下列通式的化合物、

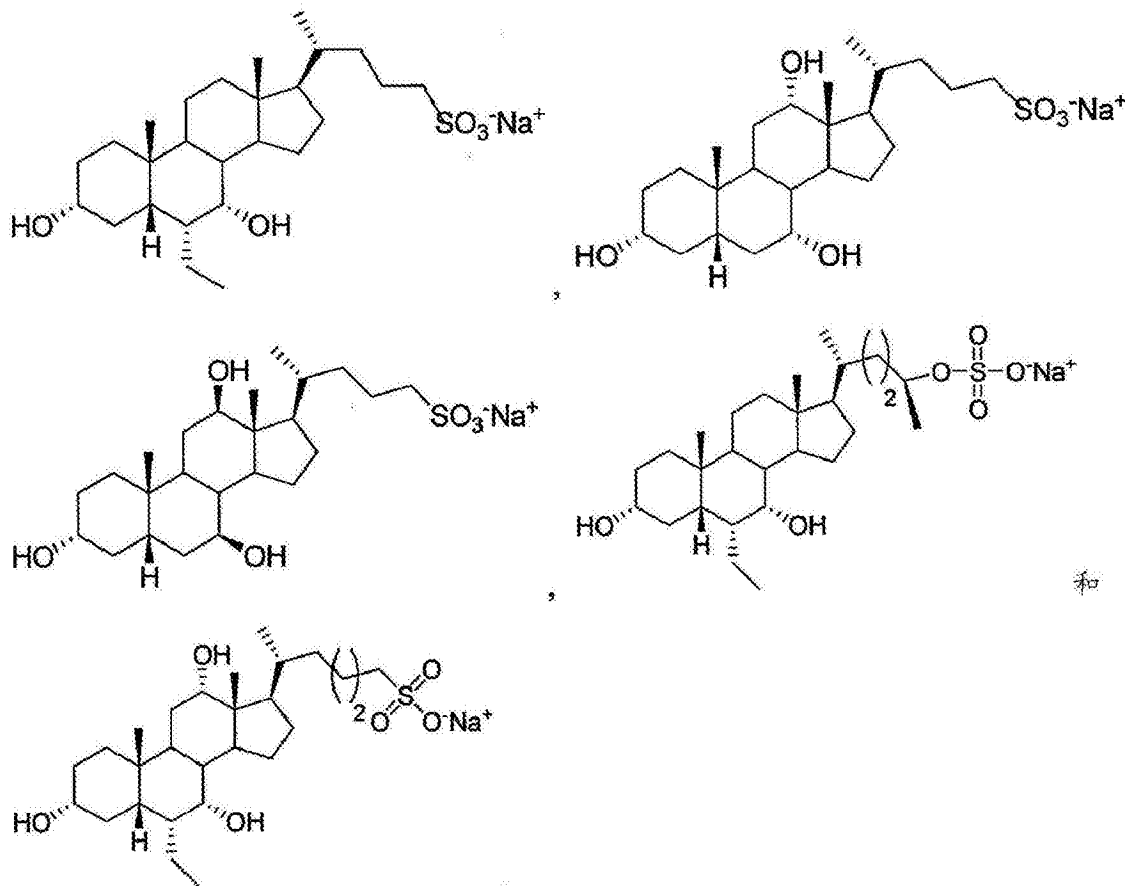
[0086]



[0087] 和 / 或其盐、溶剂化物、或氢氧化物。一方面，本发明提供化合物，其中化合物是制药用盐。

[0088] 一方面，本发明提供了选自下列通式的制药用盐。





[0090] 一方面,本发明提供了一种药物组合物,这种药物组合物包括化合物和至少一种制药用赋形剂。

[0091] 一方面,本发明提供了化合物或本发明的药物组合物的用途,治疗或者预防主体疾病的药剂制成品。另一方面,本发明提供了通过本发明的化合物或者药物组合物给药治疗或者预防主体疾病的一种方法。一方面,本发明提供了对主体施用有效剂量的本发明化合物或者药物组合物。一方面,本发明提供了施用有效剂量的本发明化合物或药物组合物。

[0092] 一方面,本发明提供了本发明的化合物或药物组合物的用途,治疗或者预防主体疾病的药剂制成品,涉及 TGR5 受体调节。本发明包括一种治疗或预防疾病的方法,涉及通过对主体施用本发明的化合物或者药物组合物调节 TGR5 受体。

[0093] 一方面,本发明提供了该用途,其中疾病选自采用具有通式 A、B、C、D、E、F、或 G 的化合物的代谢病、炎症、肝病、自身免疫性疾病、癌症、肾病、癌症、和胃肠疾病。本发明包括采用通式 A、B、C、D、E、F、或 G 的化合物治疗或预防疾病的一种方法,疾病选自代谢病、炎症、肝病、自身免疫性疾病、癌症、肾病、癌症、和胃肠疾病。本发明包括一种采用通式 A、B、C、D、E、F、或 G 的化合物治疗或者预防炎症或癌症的方法。

[0094] 一方面,本发明提供了该用途,其中疾病是选自肥胖、糖尿病、新陈代谢综合症、胰岛素抵抗、高血压、和血脂异常的代谢病。本发明包括治疗或预防选自肥胖、糖尿病、新陈代谢综合症、胰岛素抵抗、高血压、和血脂异常的代谢病的方法。

[0095] 一方面,本发明提供了该用途,其中疾病是选自过敏症、关节炎、阑尾炎、支气管哮喘、急胰腺炎、过敏性皮疹、牛皮癣的炎症性疾病。本发明包括治疗或预防选自过敏症、关节炎、阑尾炎、支气管哮喘、急性胰腺炎、过敏性皮疹、牛皮癣的炎症性疾病的方法。

[0096] 一方面,该发明提供了该用途,其中该疾病是选自类风湿关节炎、多发性硬化症、I型糖尿病的自身免疫性疾病。本发明包括治疗或预防选自类风湿关节炎、多发性硬化症、I型糖尿病的自身免疫性疾病的方法。

[0097] 一方面,该发明提供了该用途,其中,该疾病是选自发炎性肠道疾病(克罗恩病、溃疡性结肠炎)、短肠综合症(后辐射结肠炎)、微观性结肠炎、肠易激综合症(吸收不良)、细菌过度生长的消化道疾病。本发明包括治疗或预防选自炎症性肠病(克罗恩病、溃疡性结肠炎)、短肠综合症(后辐射结肠炎)、微观性结肠炎、肠易激综合症(吸收不良)、和细菌过度生长的胃肠道疾病的方法。

[0098] 一方面,本发明提供了该用途,其中,疾病是选自糖尿病肾病、慢性肾功能衰竭、高血压性肾硬化、慢性肾小球肾炎、慢性移植肾病、慢性间质性肾炎和多囊肾病的肾脏疾病。本发明包括治疗或预防选自糖尿病肾病、慢性肾功能衰竭、高血压性肾硬化、慢性肾小球肾炎、慢性移植肾病、慢性间质性肾炎和多囊肾病的肾脏疾病的方法。

[0099] 一方面,本发明提供了该用途,其中,该疾病是选自大肠癌、肝癌、肝细胞癌、胆道癌、肾癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌和脑岛癌的癌症。本发明包括治疗或预防选自大肠直肠癌、肝癌、肝细胞癌、胆道癌、肾癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌和脑岛癌的癌症的方法。

[0100] 一方面,该发明提供了该用途,其中该疾病是选自非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝疾病、慢性病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎、血色素沉着症、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、门脉高压症、胆汁饱和度下降、高雪氏症、威尔逊氏病、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、全肠外营养(TPN)、胆石症、TPN-相关的胆汁淤积和败血症的肝脏疾病。本发明包括治疗或预防选自非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝疾病、慢性病毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎、血色素沉着症、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、门脉高压症、胆汁饱和度下降、高雪氏症、威尔逊氏病、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、全肠外营养(TPN)、胆石症、TPN-相关的胆汁淤积和败血症的肝脏疾病的方法。

[0101] 一方面,本发明提供了该用途,其中,心脏疾病是选自充血性心力衰竭、心肌梗死、动脉硬化、心绞痛、动脉硬化、脑血管疾病(脑出血、中风、脑血管梗塞)。本发明包括治疗或预防选自充血性心力衰竭、心肌梗死、动脉硬化、心绞痛、动脉硬化、脑血管疾病(脑出血、中风、脑血管梗塞)的心脏疾病的方法。

[0102] 一方面,这种疾病涉及TGR5受体调节。一方面,该化合物是TGR5激动剂。一方面,该化合物是超过FXR激动剂的选择性TGR5激动剂。一方面,这种化合物是FXR的部分调节剂。一方面,这种化合物是部分FXR激动剂。

[0103] 一方面,本发明的化合物或药物组合物对主体口服、肠胃外给药、静脉注射或局部给药。一方面,主体是人。

[0104] 定义

[0105] 为方便起见,说明书、实施例和附上的权利要求中使用的某些术语收集在这里。

[0106] 术语“治疗”,本文中使用的,是指缓解、减轻、减少、消除、调节或改善,举例来说,导致疾病状态或病症衰退。治疗也可包括抑制,举例来说,抑制现有疾病状态或病症的发展,并缓解或改善,举例来说,导致现有疾病状态或病症的衰退,举例来说,当疾病状态或病症可能已存在时。

[0107] 术语“预防”,这里所使用的,是指完全或几乎完全使患者或主体发生的疾病状态

或病症停止,尤其当病人或主体倾向于这种或者有患上疾病或者病症的风险时。

[0108] “烷基”包括饱和脂肪链烷基,包括直链(例如,甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基)、支链烷基(例如,异丙基、叔丁基、异丁基)。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其骨架上有6个或更少的碳原子(例如,直链 C_1-C_6 ,支链 C_3-C_6)。在某些实施例中,直链或支链烷基在其骨架上有四个或更少的碳原子。

[0109] 如本文中使用的,“环烷基”意在包括饱和环基,如环丙基、环丁基、或环戊基。 C_{3-8} 环烷基意在包括 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 和 C_8 环烷基。

[0110] 术语“取代烷基”统指具有取代烃骨架上至少一个或多个碳原子上一个或多个氢的取代的烷基。这样的取代基可以包括,例如,烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羧氧基、芳基羧氧基、烷氧基羧氧基、芳氧基羧氧基、羧酸、烷基羰基、羰基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸盐、异辛基膦酸基、phosphinato、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二苯基氨基和烷基芳基氨基)、酰氨基(包括烷氧羰基氨基、芳羰基氨基、氨基甲酰和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、硫基、芳硫基、硫代羧酸基、硫酸盐、烷基亚磺酰基、磺酸基、氨磺酰基、磺酰、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮、杂环、烷基芳基或一个芳香基或杂芳香基。

[0111] “芳基”包括具有芳香性基团,包括5-和6员“非共轭”、或单环、可能包括从0到4个杂原子的芳香基团,以及“共轭的”,或多环,至少有一个芳香环的系统。芳基的实施例包括苯、苯基、吡咯、呋喃、噻吩、噻唑、异噻唑、咪唑、三唑、四唑、吡唑、恶唑、异恶唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、和嘧啶、以及类似基团。此外,术语“芳基”包括多环芳基,例如,三环、双环,如萘、苯并恶唑、苯并二恶唑、苯并噻唑、苯并咪唑、苯并噻吩、亚甲基二氧苯基、喹啉、异喹啉、萘啶(naphthridine)、吡啶、苯并呋喃、嘌呤、苯并呋喃、氮杂嘌呤、或氮茛。环结构上具有杂原子的芳基也被称为“芳杂环”、“杂环”,“杂芳基”或“芳杂环”(heteroaromatics)。芳香环可以在至少1个环位置被上述取代基取代,举例来说,卤素、羟基、烷氧基、烷基羧氧基、芳基羧氧基、烷氧基羧氧基、芳氧基羧氧基、羧酸酯、烷基羰基、烷基氨基羰基、芳烷基氨基羰基、烯基氨基羰基、烷基羰基、芳基羰基、芳烷基羰基、烯基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基硫代羰基、磷酸盐、异辛基膦酸基、phosphinato、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二苯基氨基和烷基芳基氨基)、酰氨基(包括烷氧羰基氨基、芳羰基氨基、氨基甲酰和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、硫基、芳硫基、硫代羧酸基、硫酸盐、烷基亚磺酰基、磺酸基、氨磺酰基、磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮、杂环、烷基芳基或芳香基或芳杂环。芳基也可与脂环或杂环结合或桥联,脂环或杂环不是芳香族,从而形成一个多环系统(如四氢化萘,亚甲二氧苯基)。

[0112] 除非另有规定碳数,“低级烷基”包括如上述定义的烷基,其骨架结构上具有1至10个碳原子,举例来说,1到6个碳原子。

[0113] 术语“酯”包括包含碳原子或杂原子结合氧原子的化合物和基团,氧原子结合羰基的碳原子。术语“酯”包括烷氧羰基,如甲氧基羰基、乙氧基羰基、丙氧基羰基、丁氧基羰基、戊氧基羰基等。烷基、烯基、或炔基如上述定义。

[0114] 术语“羟基”或“氢氧根基”包括-OH与-或-O的基团。

[0115] 术语“卤素”包括氟、溴、氯、碘等。术语“全卤化的”统指所有氢都被卤原子取代的基团。

[0116] “阴离子基团”，如本文中使用的，是指在生理 pH 条件下带负电荷的基团。阴离子基团包括羧酸根、硫酸根、磺酸根、亚磺酸根、氨基磺酸根、四唑基、磷酸根、膦酸根、亚膦酸根或硫代磷酸酯或其功能等同基团。阴离子基团的“功能等同基团”是为了包括生物电子等排体，例如，羧酸酯基团的生物电子等排体。生物电子等排体既包括经典的生物电子等排体和非经典生物电子等排体。经典与非经典的生物电子等排体是现有技术（参见，例如，Silverman, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Inc. :San Diego, Calif., 1992, pp. 19-23）。另一阴离子基团是羧酸根。

[0117] 术语“不稳定的功能性”是指包含不稳定联接的取代模式，例如生理条件下（例如，中性 pH 值范围的水溶液）易于水解或裂解的功能性或键合。不稳定功能性的实施例包括乙缩醛和缩酮。

[0118] 此外，本发明的化合物，举例来说，该化合物的盐，可以以水合物或者非水合物（无水）的形式或与其它溶剂分子作为溶剂化物存在。水合物非限定实施例包括一水合物、二水合物，等。溶剂化物的非限定实施例包括乙醇溶剂化物、丙酮溶剂化物，等。

[0119] “溶剂化物”是指包含化学计量或非化学计量溶剂的溶剂添加形式。一些化合物在结晶固体状态下倾向于捕捉固定摩尔比的溶剂分子，因此形成了溶剂。如果溶剂是水，形成的溶剂是水合物，当溶剂是乙醇时，形成的溶剂是乙醇化物。水合物是由一个或一个以上水分子与该物质中的一个结合形成水合物，其中水分子状态为 H_2O ，这样的结合能够形成一个或多个水合物。

[0120] 应该注意，本发明化合物中的一些化合物的结构包括不对称的碳原子。因此，应了解，除非特别指出，由这种不对称得到的异构体（例如，所有对映异构体和非对映异构体）包括在本发明范围内。这种异构体可通过传统分离技术和立体化学控制合成大体得到纯净物。对映异构体（R- 和 S- 构型）依据 R. S. Cahn, C. Ingold, 和 V. Prelog 开发的体系来命名。

[0121] 此外，本申请中讨论的结构和其他化合物包括其所有阿托酸异构体。阿托酸异构体是立体异构体的类型，其中两种异构体中的原子在空间的排列不同。阿托酸异构体的存在归功于中心键大基团旋转障碍导致受限旋转。这种阿托酸异构体通常以混合物存在，但由于色谱技术最新进展的结果，已经可以分离选择情况下阿托酸异构体的混合物。

[0122] “稳定化合物”和“稳定结构”为了指明化合物，其从反应混合物中一定有效程度提纯分离后充分稳固存在，配制成有效的治疗剂。

[0123] 本文中所使用的术语“类似物”是指化学化合物，结构彼此类似，但成分稍微不同（如一个原子由一个不同元素原子或特定官能团取代，或者是一个功能团被另一功能团取代）。因此，类似物是在功能和外观与参照化合物相似或相媲美的化合物。

[0124] 正如本文定义，术语“衍生物”，例如，在术语“胆汁酸衍生物”，是指化合物，具有共同核心四元环结构，并被本文所述的多种基团取代。

[0125] 本文所述的化学化合物可以拥有非对称中心。本发明化合物含有一个不对称取代原子，发明化合物可以以光学活性或外消旋形式被分离。如何制备光学活性形式，例如通过分辨消旋形式或者通过光学活性起始原料合成，这是本领域众所周知的。石蜡的多种几何异构体、C = N 双键、和类似物也可以存在于本文中描述的化合物中，所有这种稳定异构体考虑在本发明中。对顺式和反式几何异构体进行描述，可以作为异构体的混合物或分离同

分异构体形式分离出来。除非特定的立体化学或立体异构形式明确指出,所有的手性结构、非对映异构体、外消旋体和几何异构形式是预期的。用于制备本发明化合物和其得到的中间体的所有方法,在适当情况下,被认为是本发明的一部分。所示或描述的化合物的所有互变异构体,在适当情况下,也被认为是本发明的一部分。

[0126] 术语“生物电子等排体”是指化合物,由一种原子或一种基团被大致类似的另一种原子或基团取代。该生物电子等排体取代可能基于物理化学或者拓扑学。羧酸生物同位体的实施例包括酰基磺酰亚胺、四唑、磺酸盐、以及膦酸盐。参见,例如 Patani and LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176 (1996)。

[0127] 短语“制药可用的”是本领域公认的。在某些方面,该术语包括组合物、聚合物和其他材料和 / 或在剂型,在医生诊断判断范围内,适于接触人和动物组织器官中使用而没有过多的毒性、辐射、变态反应、或其他问题或并发症,具有一个合理的利益 / 风险比。

[0128] 短语“制药可用载体”,是本领域公认的,包括,举例来说,制药可用材料、组合物或载体如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料,涉及从一个组织、或身体部分向另一个组织、或身体部分携带或运输任何主体组合物。每个载体必须是“可用的”,与主体组合物的其他成分兼容并且不对病人造成损害。在某些实施方案中,制药用载体是无热源的。可起到制药用载体的一些实施例包括:(1) 糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖,(2) 淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3) 纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、醋酸纤维素(4) 粉状黄芪胶;(5) 麦芽;(6) 明胶(7) 滑石,(8) 赋形剂,如可可油和栓剂蜡;(9) 油,例如花生油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;(10) 乙二醇,如丙二醇;(11) 多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇、聚乙二醇;(12) 酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13) 琼脂;(14) 缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15) 褐藻酸;(16) 无热源水;(17) 等渗盐水;(18) Ringer' s 溶液;(19) 乙醇;(20) 磷酸盐缓冲液;及(21) 药物制剂中采用的其他非毒性兼容物质。

[0129] “组合疗法”(或“联合疗法”)包括施用本发明的化合物和作为特定治疗方案的至少一种第二药剂,为了从这些治疗剂合作得到有益疗效(例如,本发明化合物和至少一种第二药剂)。该联合治疗的有利疗效包括,但不限于,治疗药物联合给药获得的药代动力学或药效合作。这些治疗药物联合局部给药通常是在规定时间内进行(通常几分钟、几小时、几天或几周,取决于所选组合而定)。“组合疗法”可以,但通常不是,目的包括作为独立的单一治疗方案一部分的两种或多种治疗药物的给药,任意并武断导致本发明的组合。“组合疗法”目的包括按顺序施用这些治疗药物,就是,其中每个治疗剂是在不同的时间给药,以及这些治疗药物的给药,或者至少治疗药物中的两种大体同时给药。大体同时给药可被实施,举例来说,对主体施用每种治疗药物具有固定比例的单一胶囊或多个胶囊,每种治疗药物制成单一胶囊。每个治疗剂按序给药或者同时给药可受到任一适宜路线的影响,包括,但不限于,口服、静脉注射、肌肉注射、通过粘膜组织直接吸收。治疗药物可通过同一给药方式或不同给药方式施用。举例来说,所选组合的第一治疗药物可通过静脉注射给药,同时组合的另一个治疗药物可口服给药。或者,举例来说,所有治疗药物可口服给药或者所有治疗药物可静脉注射给药。治疗药物给药顺序不是很关键。

[0130] “组合疗法”也包括上述治疗药物联合其他生物活性成分的给药和非药物治疗(如,手术或机械治疗)。组合治疗进一步包括非药物治疗,只要治疗药物和非药物治疗合

作得到有益效果,非药物治疗可能在任何适宜时间进行。举例来说,在适当情况下,当仍然取得了有益效果时,非药物治疗暂时从施用治疗药物中取消,可能数天甚至数周。

[0131] 本文中采用的术语“肠胃外给药”和“肠胃外地给药”是指肠给药和局部给药之外的给药模式,通常经注射给药,包括,但不限于静脉内、肌肉、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹腔内、经气管、皮下、皮内、关节内、包膜下、蛛网膜下腔、脊椎内和胸骨内注射和灌注。

[0132] 本发明化合物、或化合物组合的“治疗有效剂量”是一种化合物化合物或几种化合物的数量(数量或浓度)。在一个实施方案中,当一个治疗有效剂量的化合物施药给主体时,疾病引发的治疗病症得到立即改善,或化合物一次或多次给药后得到改善。对主体施药的化合物的剂量,取决于特殊病症、给药方式、同时给药的化合物,必要时,主体的特,例如一般健康、其他疾病、年龄、性别、基因型,体重和耐药性。熟练的技术人员将能够依据这些和其他因素确定适宜剂量。

[0133] 术语“预防性有效剂量”指本发明化合物或化合物组合的剂量(数量或浓度),即施药以预防或减少疾病的风险,换句话说,达到预防性的或预防疾病效果所需的剂量。本化合物的给药、联合给药的剂量将取决于特定病症、给药方式、联合给药的化合物,必要时,取决于主体特征,如一般健康、其他疾病、年龄、性别、基因型、体重和耐药性。

[0134] 术语“降低风险”,如本文使用的,是指降低病人发生疾病的可能性或概率,特别当病人或主体倾向于发生这种疾病时。

[0135] 本发明化合物的“盐”是化合物产物,这种化合物产物包含离子键,其通常通过化合物与酸或者碱反应制得。

[0136] “制药用盐”是适于施药给主体的盐。

[0137] 如本文中使用的,“制药用盐”是指公开化合物的衍生物,其中母体化合物是通过制备其酸或者碱进行改性。制药用盐的实施例包括,但不限于,碱基团的矿物盐或有机酸盐如胺,碱或者酸性基团如羧酸的有机盐;和类似物质。制药用盐包括传统的非毒性盐,或者,举例来说,由无毒的无机酸或有机酸形成的母体化合物的季铵盐。举例来说,这种传统的非毒性盐包括,但不限于,由无机和有机酸衍生那些,有机酸选自 2-乙酰氧基苯甲酸、2-羟基乙烷磺酸、乙酸、维生素 C、苯磺酸、苯甲酸、重碳酸、碳酸、柠檬酸、乙二胺四乙酸、乙烷二磺酸、乙烷磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、谷氨酸、甘醇酸、glycollyarsanilic、己基间苯二酚、hydrabamic、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟基马来酸、羟基萘甲酸、羟乙基磺酸、乳酸、乳糖酸、十二烷基磺酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲烷磺酸、napsylic、硝酸、草酸、亚甲基双羟萘酸、泛酸、苯乙酸、磷酸、多聚半乳糖醛酸、丙酸、水杨酸、硬脂酸、subacetic、琥珀酸、氨基磺酸、氨基苯磺酸、硫酸、鞣酸、酒石酸和甲苯磺酸。

[0138] 本发明的制药用盐可以从母体化合物由传统的化学方法合成得到,母体化合物包含碱基或酸基。一般来说,这种盐可以通过这些化合物的游离酸或碱形式与适宜的碱的水溶液或酸的水溶液或者碱的有机溶剂或者酸的有机溶剂,或者两者混合物进行反应制备得到;通常情况下,非水介质如醚、醋酸乙酯、乙醇、异丙醇、或者乙腈是优选的。适宜的盐的名单在雷明顿制药学中找到,第 18 版,麦克出版公司,伊士顿,美国宾夕法尼亚州,第 1445 页(1990)。

[0139] “药物组合”是包含本发明化合物并以适于对主体给药的剂型的制剂。在另一个实

施方案中,药物组合物是散装或单位剂型。单位剂型是多种剂型中的任一种,包括,举例来说,胶囊、静脉注射袋、片剂、气雾剂吸入器上的单泵,或小瓶。单位剂量药物组合物中的有效成分的数量(例如,发明化合物或其盐的制剂)是有效剂量的,并且根据特殊治疗而进行改变。本领域中的技术人员应明白,有时需要依据患者年龄和病症进行配药路线变更。剂量也将取决于给药方式。多种给药方式在考虑范围内,包括口腔、肺、直肠、静脉、透皮、皮下、静脉注射、肌肉注射、腹腔内、鼻内、等等。本发明化合物的局部或透皮给药剂型包括粉末、喷雾剂、软膏、油膏、面霜、乳液、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。在另一个实施方案中,活性化合物在无菌条件下与制药用载体、任何一种防腐剂、缓冲剂、或所需的推进剂混合。

[0140] 术语“闪释给药”是指迅速分散剂型的化合物制剂。

[0141] 术语“速释”被定义为化合物在相对短暂时间内从剂型中释放出来,一般可达约 60 分钟。所谓“缓释”定义包括延迟释放、延长释放、和脉冲释放。术语“脉冲释放”被定义为药物从一种剂型中系列释放出来。术语“缓释”或“延迟释放”定义为在一个较长时间内化合物从剂型内持续释放。

[0142] “主体”包括哺乳动物,例如人类、伴侣动物(如狗、猫、鸟、和类似动物),农场动物(如牛、羊、猪、马、鸡、和类似动物)和实验动物(例如,老鼠、小鼠、豚鼠、鸟、和类似动物)。通常情况下,主体是人。

[0143] 本发明的化合物也包括前药或生理等效衍生物。“前药”或“生理等效衍生物”包括体内代谢转化生成活性药物的前体形式的药物。本发明进一步考虑了前药的使用用途,这种前药体内转变成本发明方法中使用的 TGR5 调节化合物(例如, R. B. Silverman, 1992, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", Academic Press, Chp. 8)。这种前药可以用于改变生物分布(例如,化合物通常不穿过血脑屏障)或者 TGR5 调节化合物的药代动力学。举例来说,阴离子基团,例如,羧酸根、硫酸根或磺酸根,可被酯化,例如,采用烷基(例如,甲基)或苯基,生成酯。当对主体施用酯时,酯被切割、酶解和非酶解,还原或水解,显示出阴离子基团。这种酯可以为环状,例如,环状硫酸酯或砒,或两个或更多阴离子基团可能是通过一个连接基团酯化。阴离子基团可以采用某些基团进行酯化(如酰氧基甲基酯 acvloxyethyl ester),这些基团被切割显示出中间体 TGR5 调节化合物,随后分解生成活性 TGR5 调节化合物。在一个实施方案中,前药是还原型的羧酸酯、硫酸酯或磺酸酯,如乙醇或硫醇,体内氧化成 TGR5 调节化合物。此外,阴离子基团可酯化成体内积极运送的基团,或者有选择性地被靶器官吸收。

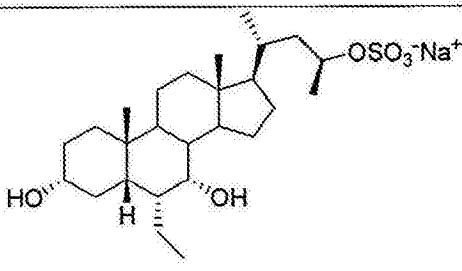
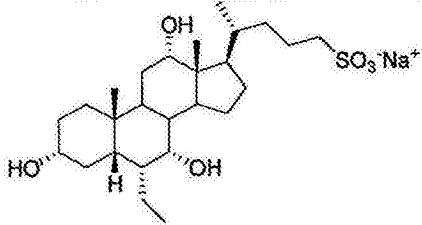
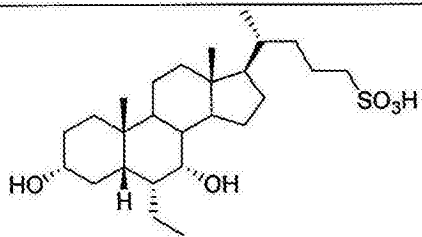
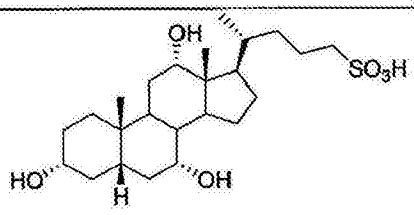
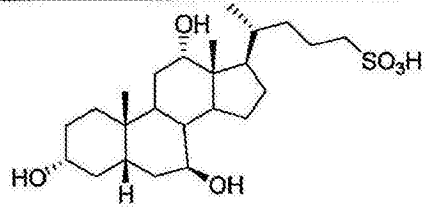
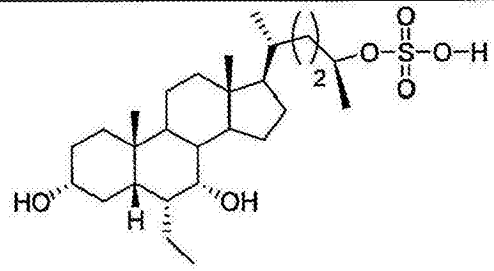
[0144] 术语“TGR5 调节剂”是指与 TGR5 受体相互作用的任何化合物。这种相互作用不限于起到 TGR5 受体的拮抗剂、激动剂、部分激动剂或反向激动剂的作用的化合物。一方面,本发明的化合物起到 TGR5 受体的拮抗剂的作用。在另一个方面,本发明的化合物起到 TGR5 受体的激动剂的作用。在另一个方面,本发明的化合物起到 TGR5 受体的部分激动剂的作用。在另一个方面,本发明的化合物起到 TGR5 受体的反向激动剂的作用。配体性质,传统的、内源性或合成的,其特征在于 1966 年 Furchgott 最初描述的内在功效 e' 。它是用来表达当占据相同数量受体时不同配体得到不同生物反应的程度。通常,“激动剂”是指提高了另一个分子或受体部位活性的化合物。激动剂,经古典定义,是否具有结合受体的特性正构、变构、反向激动剂或共同激动剂,改变其受体状态并导致生物学作用。因此,激动被定义为产生生物学作用的激动剂或配体的性质。与此相反,“拮抗剂”实质上是对同一受体大分子

具有高亲和力的激动剂,但具有非常少或可忽略的内在功效,因此空间阻止激动剂的生物学作用。作为一种性能,对抗可能是功能上或生理学上的,其中激动剂通过受体-信使系统直接竞争形成体效应和对抗效应中的受体部位。更尤其是,TGR5 激动剂是受体配体或化合物,结合 TGR5 并增加表达受体的细胞内环磷酸腺苷(cAMP)浓度至少 20%。相反,TGR5 拮抗剂将是拮抗或阻止激动剂活性从而达到 cAMP 浓度减少的化合物。

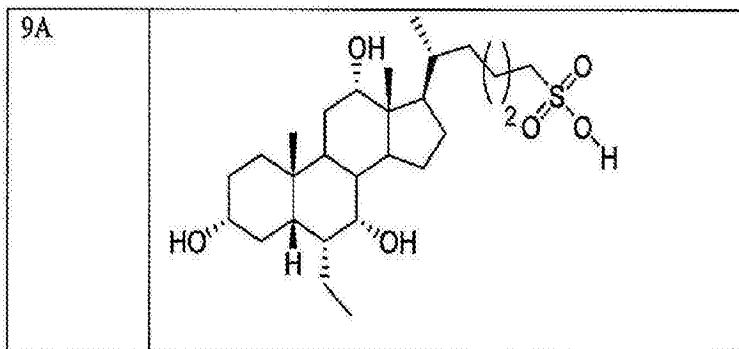
[0145] 本发明涉及具有 TGR5 受体调节活性的化合物,其用于治疗 and 预防代谢性疾病如代谢疾病、炎症、肝病、自身免疫性疾病、心脏病、肾病、癌症和胃肠疾病。

[0146] 本发明的一些代表性的化合物如下所示。

[0147]

化合物编号	结构
2A	
3A	
4A	
6A	
7A	
8A	

[0148]



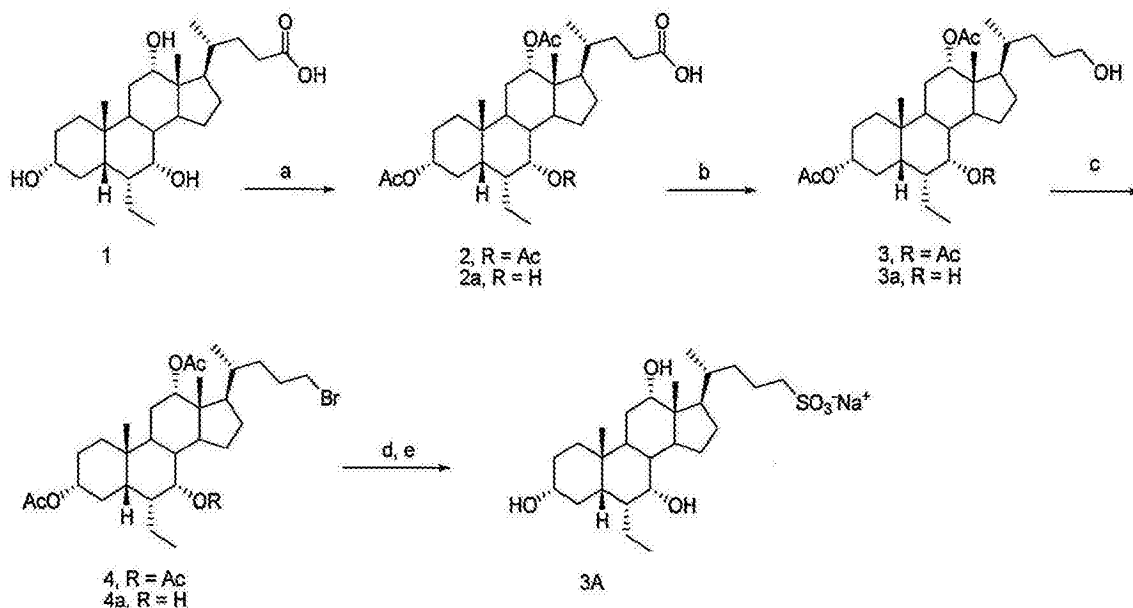
[0149] 本文中引用的所有出版物和专利文献通过引述合并于本文中,相当于每个出版物或文献特别且单独被指出通过引述合并于本文中。引用出版物和专利文献的目的不是承认出版物和专利文献是相关的现有技术,也不是承认他们的内容或日期。本发明现在通过书面描述进行说明,本领域技术人员能认识到本发明可以在多个实施方案中实施,上述描述和下面的实施例是为了举例说明的目的,不是限制本申请的权利要求。

[0150] 实施例 1:合成 TGR5 调节剂

[0151] 本发明化合物,和相关的衍生物,可通过本领域技术人员周知的方法合成得到。

[0152] 实施例 1A:合成 3 α , 7 α , 12 α -三羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷-24-磺酸钠盐 (3A)

[0153]



[0154] 试剂和条件:a) 三乙胺,4-吡咯烷-吡啶,乙酸酐 Ac_2O ,二氯甲烷,0 $^\circ\text{C}$ (2 : 2a = 70 : 30), b) 三乙胺, ClCOOEt ,四氢呋喃, NaBH_4 ,41%的上式中的化合物 1(3 : 3a = 70 : 30);c) 三苯基膦、 Br_2 、咪唑、二氯甲烷,45% (4 : 4a = 70 : 30);d) 亚硫酸钠、乙醇;e) 5%的氢氧化钠水溶液,93%。总产量:17%。

[0155] 3 α , 7 α , 12 α -三乙酰氧基-6 α -乙基-5 β -胆烷-24-酸 (2) :

[0156] 向一个冷却 (0 $^\circ\text{C}$) 并正搅拌的含有 4-吡咯烷吡啶 (9mg, 0.057mmol) 的蒸馏二氯甲烷 (5ml) 悬浮液 1 (250mg, 0.572mmol) 中加入蒸馏三乙胺 (0.78ml, 5.430mmol)。随后,在氮气气氛下逐滴加入乙酸酐 (0.49ml, 5.140mmol)。经过 20', 溶液加热至室温,搅拌过夜。该混合物减少压力下浓缩,得到的残留物用盐酸酸化并用 15ml 乙酸乙酯提取 3 次。用

15ml 盐水洗涤有机层,用无水硫酸钠干燥,在减压条件下浓缩,得到 290mg 的产物 2(70%) 和 3 α ,7 α -三乙酰氧基-7 α -羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷-24-酸(2a,30%)的混合物,结果如¹H-NMR 分析所示。该混合物用于以下步骤没有进一步纯化。

[0157] ¹H-NMR(200MHz, CDCl₃) δ : 0.69(3H, s, 18-CH₃ of 2), 0.75(3H, s, 18-CH₃ of 2a), 0.80-0.88(m, 9H, m, 19-CH₃+21-CH₃+CH₂CH₃ of 2 和 2a), 2.05(9H, m, 3x CH₃COO-of 2

[0158] 3 α ,7 α ,12 α -三乙酰氧基-6 α -乙基-24-羟基-5 β -胆烷(3):

[0159] N₂气氛下,向含有产物 2 的 35ml 蒸馏的四氢呋喃溶液(290mg,前步骤的粗产物)中加入蒸馏三乙胺(0.75ml,5.148mmol),然后加入氯甲酸乙酯(0.44ml,4.576mmol)(注:白色沉淀形成)。采用薄层色谱仪(石油醚/乙酸乙酯=6:4)监测反应,混合物搅拌 2h,直至起始原料完全反应。当向混合物逐滴加入 3ml NaBH₄(326mg,8.580mmol)的水溶液,反应混合物搅拌过夜。加入 30ml 水和 3N 盐酸(10ml),采用 20ml 乙酸乙酯提取该混合物,提取 3 次。用 15ml 盐水洗涤有机层,用无水硫酸钠干燥,在减压条件下浓缩。采用 BiotageTM 经快速柱色谱柱层析法提纯生成的残留物(柱:12+M,石油醚中含 5%至 55%的乙酸乙酯),得到 130mg(~41%)产物 3(70%)和 3 α ,12 α -三乙酰氧基-7 α ,24-二羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷(3a,30%)的混合物,结果如¹H-NMR 分析所示。该混合物用于以下步骤没有进一步纯化。

[0160] ¹H-NMR(200MHz, CDCl₃) δ : 0.66(3H, m, 18-CH₃ of 3 和 of 3a), 0.75-0.85(m, 9H, m, 19-CH₃+21-CH₃+CH₂CH₃ of 3 和 of 3a), 3.55(2H, m, 24-CH₂OH of 3 和 of 3a), 3.67(m, .1H, .7-CH-OH of 3a), 4.52(m, 3-CHOAc of 3 和 of 3a), 4.99-5.06(2H, m, 12-CHOAc of 3 和 3a 和 7-CHOAc of 3)。

[0161] 3 α ,7 α ,12 α -三羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷-24-磺酸盐(3A):

[0162] N₂气氛下,向含有蒸馏二氯甲烷(4ml)的三苯基膦(270mg,前步骤的粗产物)的溶液中加入溴(0.02ml,0.426mmol)和咪唑(0.02ml,0.426mmol),将混合物搅拌 10'。逐滴加入产物 3(130mg,0.237mmol)的蒸馏二氯甲烷(4ml)溶液,搅拌混合物,直至起始原料完全反应。然后加入 20ml 二氯甲烷,反应混合物采用 20ml 水洗涤,洗涤 3 次,15ml 盐水洗涤 1 次,用无水硫酸钠干燥,在减压条件下浓缩。采用 BiotageTM 经快速柱色谱柱层析法提纯生成的残留物(柱:12+M,石油醚中含 5%至 55%的乙酸乙酯),得到 65mg(~45%)产物 4(70%)和 3 α ,12 α -三乙酰氧基-7 α ,24-二羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷(4a,30%)的混合物。

[0163] 然后,这种混合物溶解在 10ml 乙醇中,逐滴加入含有 5%的亚硫酸钠水溶液中(9ml),反应在 90°下搅拌 12 小时。该混合物加热至室温并搅拌过夜。反应混合物中减压下浓缩,产生的残留物用 15ml 水稀释,3N 盐酸酸化,采用 15ml 二氯甲烷萃取该混合物 3 次。用 15ml 盐水洗涤有机层,用无水硫酸钠干燥,在减压条件下浓缩。由此产生的残留物用 5%氢氧化钠水溶液(15ml)处理并回流 24 小时。混合物在减压条件下浓缩,残留物用 15ml 水稀释,15ml 二氯甲烷洗涤 2 次,用 3N 盐酸酸化,用 25ml 比例为 8:2 的乙酸乙酯/甲醇溶液萃取,萃取三次。有机层用无水硫酸钠干燥,在减压条件下浓缩。由此产生的残留物经中压层析纯化(柱:"RP-I 8Lobar B",甲醇/水=6:4,50psi),得到 3 α ,7 α ,12 α -三羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷-24-磺酸钠盐,3A(47mg,93%)。

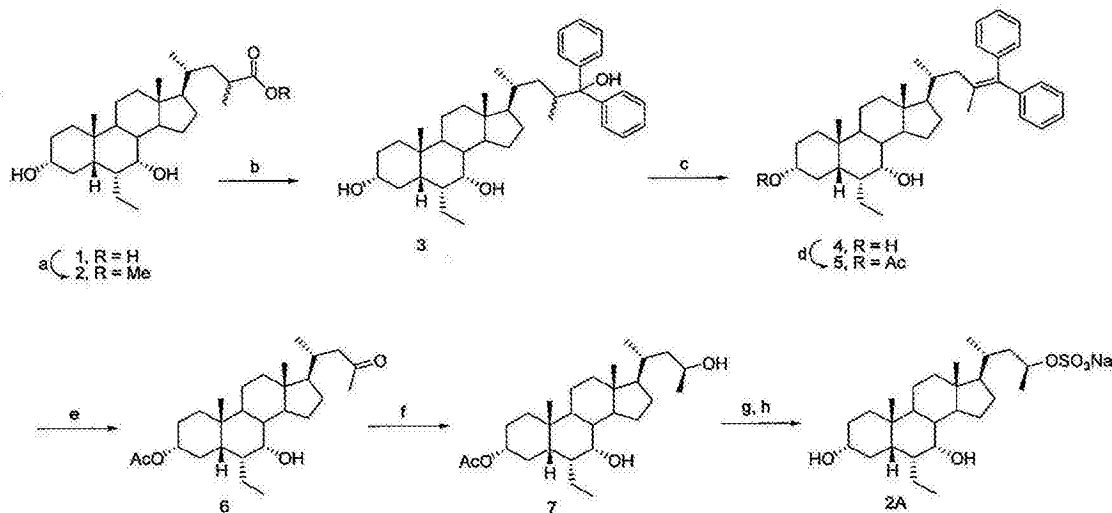
[0164] Mp:>280°C

[0165] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ :0.72(3H, s, 18- CH_3), 0.90(6H, m, 19- CH_3 和 CH_3CH_2), 1.04(3H, d, $J = 6.51\text{Hz}$, 21- CH_3), 1.89(1H, m, 23-CH), 2.70(2H, m, 24- CH_2SO_3), 3.30(1H, m, 3-CH), 3.68(1H, m, 7-CH), 3.98(1H, m, 12-CH).

[0166] $^{13}\text{C-NMR}$ (100.3MHz, CD_3OD) δ :10.41, 11.41, 16.27, 21.20, 21.84(2), 22.54, 26.57, 27.14, 28.03, 29.38, 32.71, 34.59, 34.63, 35.05, 35.40, 40.06, 41.40, 41.48, 45.25, 45.85, 46.63, 51.50, 69.58, 71.50, 72.40.

[0167] 实施例 1B: 合成 3 α , 7 α , 23-三羟基-6 α -乙基-23(S)-甲基-24-失碳(nor)-5 β -胆烷-23-硫酸钠盐(2A)

[0168]



[0169] 试剂和条件:a) 甲醇, 对甲苯磺酰胺, us, 30 $^{\circ}\text{C}$, 2h, 97%。b) PhMgBr , 四氢呋喃, 回流, 12 小时。c) 乙醇, HCl , 回流, 12 小时, 84% 的前述化合物 2。d) 乙醚, 吡啶, 4-二甲氨基吡啶, 四氢呋喃, 25 $^{\circ}\text{C}$, 12h, 79%。e) 臭氧, 二甲基硫醚, 二氯甲烷, 甲醇, -78 $^{\circ}\text{C}$, 20min, 70%。f) NaBH_4 , MeOH , 四氢呋喃, 25 $^{\circ}\text{C}$, 12h, 48% (S); g) PySO_3 , pyridine ; h) 含有 5% 的氢氧化钠的甲醇溶液, 43%。总产量: 9%。

[0170] 3 α , 7 α -二羟基-23-甲基-6 α -乙基-5 β -胆烷酸甲酯(2)

[0171] 向含有产物 1(2.0g, 4.6mmol) 的 150ml 甲醇中加入对甲苯磺酰胺(0.2g, 1.05mmol), 混合物超声处理 90'。溶剂在减压下蒸发, 残留物溶解于 200ml 三氯甲烷中, 用 100ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 洗涤 2 次, 100ml 水和 100ml 盐水洗涤。用无水硫酸钠干燥有机层, 蒸干得到甲酯 2(2.0g, 97%) 的白色固体。

[0172] 3 α , 7 α -二羟基-23-甲基-6 α -乙基-5 β -双失碳胆甾烷二苯基乙烯(4)

[0173] 向甲酯 2(1.35g, 3.01mmol) 的新蒸的四氢呋喃(15ml) 溶液中加入苯基溴化镁(24.1ml, 四氢呋喃中含有 1M), 由此产生的混合物回流过夜。该溶液室温下放置, 逐滴加入 3N 盐酸溶液(30ml), 混合物搅拌 30 分钟。有机相被分离出, 水相采用 50ml 乙酸乙酯萃取, 萃取 3 次。合并的有机层用 100ml 盐水洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 减压下蒸干, 得到中间产物 3, 用于以下步骤没有进一步纯化。棕色的粗产物溶解在 35ml 乙醇和 12N 盐酸(1ml) 的混合物中, 混合物回流过夜。然后, 真空中蒸发溶剂, 残留物溶解在 100ml 二氯甲烷中, 用 60ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 洗涤 2 次, 60ml 水和 60ml 盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 减压下蒸发。残留物经快速层析法提纯, 采用比例为 98 : 2 的三氯甲烷 / 甲醇溶液洗脱得到预

期的衍生物 4 的白色固体 (1.40g, 产物 2 的 84%)。

[0174] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.7 (3H, s, 18- CH_3), 0.85 (3H, d, $J = 6.5\text{Hz}$, 21- CH_3), 0.88-0.92 (6H, m, 19- $\text{CH}_3 + \text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.97-1.22 (6H, m), 1.23-1.52 (9H, m), 1.57-1.70 (5H, m), 1.78-1.85 (4H, m), 1.92-1.95 (1H, m), 3.40-3.42 (1H, m, 3-CH), 3.69 (1H, bs, 7-CH), 7.25-7.29 (4H, m, ArH), 7.127.23 (6H, m, ArH).

[0175] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 11.6, 11.7, 17.8, 20.0, 20.6, 22.2, 23.1, 23.6, 28.4, 30.5, 33.12, 33.8, 34.8, 35.4 (2x), 39.4, 39.9, 41.1, 41.6, 42.8, 45.1, 50.4, 56.8, 70.8, 72.3, 125.8, 127.8 (4x), 128.6 (4x), 129.8 (2x), 138.8, 143.4.

[0176] 3 α -乙酰氧基-7 α -羟基-23-甲基-6 α -乙基-5 β -双失碳胆甾烷二苯基乙烯 (5)

[0177] 向产物 4 的 (1.85g, 3.33mmol) 新蒸的四氢呋喃 (15ml) 溶液中加入乙酸酐 (0.35ml, 3.66mmol)、吡啶 (0.05ml, 0.66mmol)、4-二(甲氨基)-咪啉 (28mg, 0.23mmol), 由此产生的混合物在室温下搅拌过夜。该混合物用 70ml 水稀释, 用 50ml 乙酸乙酯萃取三次。合并的有机层用 50ml 水洗涤, 洗涤 2 次, 50ml 盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥并减压蒸发得到预期的乙酰化的化合物 5 的白色固体 (10.57g, 79%), 产物用于以下步骤没有进一步纯化。

[0178] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.65 (3H, s, 18- CH_3), 0.85 (3H, d, $J = 6.5\text{Hz}$, 21- CH_3), 0.87-0.92 (6H, m, 19- $\text{CH}_3 + \text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.95-1.26 (8H, m), 1.30-1.50 (6H, m), 1.52-1.70 (5H, m), 1.75 (3H, s, 24- CH_3), 1.79-1.97 (5H, m), 2.01 (3H, s, 3- $\text{CHOC}(O)\text{CH}_3$), 2.14-2.17 (1H, m), 3.69 (1H, bs, 7-CH), 4.52-4.57 (1H, m, 3-CH), 7.11-7.22 (6H, m, ArH), 7.25-7.29 (4H, m, ArH).

[0179] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 11.6, 11.8, 17.9, 20.1, 20.7, 21.4, 22.2, 23.1, 23.7, 26.6, 28.4, 29.6, 33.1, 34.9, 35.2, 35.5, 39.5, 40.0, 41.2, 41.6, 42.9, 45.1, 50.4, 56.9, 70.7, 74.7, 125.8, 127.8 (4x), 129.5 (4x), 129.8 (2x), 134.0, 138.9, 143.5.

[0180] 3 α -乙酰氧基-7 α -羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷-23-酮 (6)

[0181] 保存在 -78°C 下的含有产物 5 (1.35g, 2.26mmol) 的 15ml 干甲醇和 20ml 干燥二氯甲烷的混合物溶液进行臭氧化处理, 直到深蓝色持续 30 分钟。当臭氧中断时, 氮气带走深蓝色溶液中释放的臭氧。当反应不再是蓝色时, 加入二甲基硫醚 (0.55ml, 7.55mmol), 溶液温度降至室温。减压下出去溶剂, 残留物经快速层析法提纯, 采用含有 2% 至 15% 的乙酸乙酯的石油醚洗脱, 得到预期的酮 6 的白色固体 (0.7g, 70%)。

[0182] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.7 (3H, s, 18- CH_3), 0.85-0.9 (9H, m, 19- $\text{CH}_3 + 21-\text{CH}_3 + \text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.04-1.23 (7H, m), 1.29-1.46 (8H, m), 1.58-1.72 (4H, m), 1.78-1.97 (5H, m), 2.00 (3H, s, 3- $\text{CHOC}(O)\text{CH}_3$), 2.11 (1H, s, 24- CH_3), 2.43-2.53 (1H, m), 3.70 (1H, bs, 7-CH), 4.48-4.59 (1H, m, 3-CH).

[0183] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 11.6, 11.8, 19.7, 20.7, 21.5, 22.1, 23.1, 23.7, 26.6, 28.4, 29.6, 30.6, 32.6, 33.1, 35.1, 35.5, 39.5, 39.9, 41.1, 42.8, 45.0, 50.5, 50.9, 56.0, 70.7, 74.7, 170.7, 209.3.

[0184]

[0185] 0°C 下, 向正搅拌的酮 6 (0.5g, 1.12mmol) 的四氢呋喃溶液中加入一部分

NaBH₄ (0.27g, 7.17mmol), 然后逐滴加入甲醇 (0.27ml, 6.76mmol)。在滴加结束后, 反应加入至室温, 搅拌过夜。溶剂蒸发至干, 残留物溶解在二氯甲烷和 3N 盐酸中, 搅拌 1 小时。两相分离, 有机层用水、盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 并在减压下蒸干。油性残留物, 薄层色谱证实由两种组分组成, 经快速层析法提纯 (石油醚 / 乙酸乙酯 = 7 : 3), 首先得到 3 α -乙酰氧基-7 α , 23(S)-二羟基-6 α -乙基-5f3-胆烷 7 (0.225g, 48%), 更多极性的 3 α -乙酰氧基-7 α , 23(R)-二羟基-6 α -乙基-5f3-胆烷 (0.105g, 23%), 其比例为 2 : 1。

[0186] ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.7 (3H, s, 18-CH₃), 0.88-0.91 (6H, m, 19-CH₃+CH₂CH₃), 0.97 (3H, d, J = 6.4Hz, 21-CH₃), 1.04-1.08 (4H, m,), 1.19 (3H, d, J = 6.1, 24-CH₃), 1.26-1.56 (12H, m), 1.53-1.71 (5H, m), 1.76-1.96 (4H, m), 2.0 (3H, s, 3-CHOC(O)CH₃), 3.72 (1H, bs, 7-CH), 3.79-3.95 (1H, m, 23-CH), 4.51-4.59 (1H, m, 3-CH)。

[0187] ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 11.6, 11.8, 18.5, 20.7, 21.5, 22.1, 23.1, 23.7, 24.8, 26.6, 28.4, 29.6, 32.6, 33.1, 35.1, 35.5, 39.6, 39.9, 41.1, 42.8, 45.0, 45.8, 50.5, 56.7, 65.1, 70.7, 74.7, 170.7。

[0188] 6 α -乙基-23(S)-甲基-3 α , 7 α , 23-三羟基-24-失碳-5 β -胆烷-23-硫酸钠盐 (2A)。

[0189] 向三氧化硫吡啶复合物 (0.1g, 0.49mmol) 的 5ml 干燥吡啶的悬浮液中加入乙醇 7 (0.2g, 0.49mmol), 由此产生混合物在氮气氛围中于室温下搅拌 48 小时, 溶剂减压下蒸发。残留物溶解在含有 5% 氢氧化钠的 2ml 甲醇中, 并在室温下搅拌过夜。溶剂在减压下蒸发, 得到的固体在比例为 1 : 1 的水 / 甲醇混合物中, 经反相层析纯化 (柱 RP-18 lobar B), 采用甲醇 / 水 (从 5 : 5 至 8 : 2) 作为流动相, 得到预期硫酸盐, 3 α , 7 α , 23-三羟基-6 α -乙基-23(S)-甲基-24-失碳-5 β -胆烷-23-硫酸钠盐, 2A (0.11g, 43%)。

[0190] ¹H-NMR (CD₃OD) δ : 0.7 (3H, s, 18-CH₃), 0.89-0.94 (6H, m, CH₃-19, CH₂CH₃), 1.01 (3H, d, J = 6.4Hz, 21-CH₃), 1.09-1.29 (4H, m,), 1.32 (3H, d, J = 6.1, 24-CH₃), 1.36-1.41 (5H, m), 1.47-1.61 (6H, m), 1.71-1.89 (9H, m), 2.02-2.05 (1H, m), 3.28-3.35 (1H, m, 3-CH), 3.66 (1H, bs, 7-CH), 4.54-4.58 (1H, m, 23-CH)。

[0191] ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 12.0, 12.3, 19.4, 21.9, 22.4, 23.5, 23.7, 24.6, 29.4, 31.3, 33.5, 34.4, 34.5, 36.6, 36.7, 41.1, 41.5, 43.1, 43.8, 45.5, 46.9, 51.7, 58.1, 71.2, 73.2, 74.8。

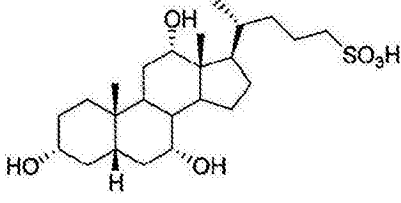
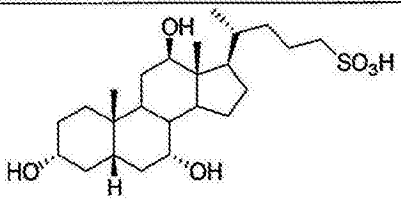
[0192] 实施例 2 : TGR5 和 FXR 体外活性

[0193] 采用体外实验, 本发明化合物对 TGR5 受体的潜能和效用进行了评估。表 1 表明, 本发明化合物是有效的并且是具有选择性的 TGR5 调节剂。在本发明的一些方面中, 化合物是双 FXR 和 TGR5 激动剂。

[0194] 表 1 : 本发明化合物对 FXR 和 TGR5 受体的潜能和效用

[0195]

化合物 (参照标准)	Alphascreen 检测	FRET (cAMP) NCL-H716	转录活性 检测	TGR5 过表达 HEH293 细胞的 FRET-cAMP 含量
	hFXR (CDCA=8-25 μM) EC ₅₀ (μM)	hTGR5 (LCA=4-8 μM) EC ₅₀ (μM)	hTGR5 (LCA=1-6 μM) EC ₅₀ (μM)	hTGR5 (LCA=0.3-5 μM) EC ₅₀ (μM)
2A	0,145 \pm 0.05	1,6 \pm 0,3	1,2 (LCA=6,2)	0,025 (LCA=0,3)
3A	7 \pm 3	0,7 \pm 0,2	0,6 (LCA = 6,2)	0,011 (LCA = 0,3)

化合物 编号		结构	TGR5 EC50	TGR5 效用
6A	JMC2008 37		1.00 μM	103
7A	JMC2008 41		5.02 μM	109

[0196] 体外 TGR5 受体结合检测的描述, 参见, 例如, Kawamata, J. Biol. Chem 2003, Vol. 278No. 11, p. 9435-9440。采用无细胞 ELISA, 荧光能量共振转移 (FRET) 检测 FXR 的活性, 人 FXR 的 SRC-1 肽募集。参见, Blanchard 等人 WO 00/37077。荧光素酶活性在稳定表达 hTGR5 或 hTGR5 瞬时表达载体和 cAMP- 反应元件 (CRE) 驱动的荧光素酶报告基因共转染的 CHO 细胞内测定。部分化合物进一步接受荧光素酶报告基因检测对其激活核胆汁酸受体 FXR 进行评分。

[0197] 举例来说, 下面的材料和方法被用于确定表 1 中的数据。

[0198] 质粒

[0199] 美国国立卫生研究院哺乳动物基因收集克隆 MGC :40597 (又名 pCMVSPORT6/hTGR5 或 pTGR5) and pcDNA3.1 (+) 购自 Invitrogen 公司 (卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)。PCRE-Luc 和 pCMV β 购自 Clontech (帕洛阿尔托, 加利福尼亚州)。pCMX-hFXR 和 pCMX-mRXR α 由 David J. Mangelsdorf 博士提供 (霍华德休斯医学研究所, 德克萨斯大学西南医学中心)。pEcREx7-Luc 由 Richard A. Heyman 博士提供 (X-ceptor Therapeutics, 加利福尼亚州)。

[0200] 细胞培养

[0201] 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、NCI-H716 细胞、Hep3B 细胞和 COS1 细胞购自美国模式培养物保藏中心 (马纳萨斯, 弗吉尼亚州)。细胞培养基、血清和补充剂由 Invitrogen 或 Sigma-Aldrich 公司提供。所有的 CHO 细胞均维持在 MEM α 培养基 (α -MEM) 内, 辅以 10% (v/v) 胎牛血清和 100 μ M 非必需氨基酸 (NEAA)。NCI-H716 细胞维持在 RPMI-1640 悬浮液中, 辅以 10% (v/v) FBS、10mM HEPES 和 1mM 焦葡萄糖酸钠。Hep3B 细胞维持在 Eagle's 培养基中, 辅以 10% (v/v) FBS 和 100 μ M NEAA。COS1 细胞维持在 DMEM 培养基中, 辅以 10% (v/v) FBS。所有的细胞培养基中配有 100units/ml 青霉素和 100 μ g/ml 硫酸链霉素。细胞培养在 37 $^{\circ}$ C 含有 5% 的二氧化碳的气氛中, 每隔 2-6 天完成, 新的培养板用于每个实验。

[0202] 瞬时转染

[0203] 依据厂商说明书, CHO 细胞覆盖在 96 孔板内密度 3.5×10^4 个细胞 / 孔, 培养 24 小时, 然后采用脂质体 2000 转染试剂 (Invitrogen 公司生产), 转染 150ng 人 (h) TGR5 表达质粒 (pCMVSPORT6/hTGR5) 和 100ng cAMP- 应答元件 (CRE) 驱动的荧光素酶报告质粒 (PCRE-Luc)。培养 6 小时后, 细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗一次, 介质交换成含 0.1% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 的 DMEM。再培养 18 小时后, 细胞经含有 0.1% (w/v) 牛血清白蛋白的不同浓度化合物的新鲜 DMEM 处理 5 小时。处理后, 用 50 μ l 细胞裂解液溶解 (25mM Tris-Cl (pH7.6)、2mM 乙二胺四乙酸、1mM 二硫苏糖醇 (DTT)、10% (v/v) 甘油、和 1% (v/v) 和 1% (v/v) 曲拉通 X-100), 经过冻融循环裂解细胞, 并且进行如下描述的荧光素酶检测。

[0204] COS1 细胞覆盖在 96 孔板内, 密度 2.5×10^4 个细胞 / 孔, 辅以 10% (v/v) 活性炭处理胎牛血清, 培养 24 小时, 然后采用脂质体 2000 转染试剂 (Invitrogen 公司生产), 转染 hFXR 表达质粒 (pCMX-hFXR)、25ng 鼠 (m) 视黄醇 X 受体 α (RXR α) 表达质粒 (pCMX-mRXRa)、50ng 受体质粒 (pEcREx7-Luc) 和每个孔内作为内参照的 50ng pCMV β 。24 小时后, 细胞用磷酸盐缓冲液清洗两次, 细胞经配有 10% (v/v) 活性炭处理胎牛血清的含有不同浓度化合物的新鲜 DMEM 处理 24 小时。处理后, 用 50 μ l 细胞裂解液溶解, 经过冻融循环裂解细胞, 进行如下描述的荧光素酶和 β -半乳糖苷酶检测。

[0205] 荧光素酶和 β -半乳糖苷酶检测

[0206] 对于荧光素酶检测, 20 μ l 细胞裂解液与 100 μ l 荧光素酶反应缓冲液 [235 μ M luciferine、265 μ M 三磷酸腺苷、135 μ M 辅酶 A (CoA)] 进行混合, 采用 CentroXS3LB960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) 测定荧光。 β -半乳糖苷酶检测, 10 μ l 细胞裂解液与 100 μ l 缓冲液 Z [60mM 磷酸氢二钠、10mM 氯化钾, 1mM 硫酸镁和 50mM β -巯基乙醇和 0.75mg/ml 邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)] 进行混合, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 0.5 小时至 3 小时。加入 50 μ l 终止反应缓冲液 (1M 碳酸钠) 停止反应, 在 420nm 波长下测定光学密度。

[0207] 建立 CHO 细胞稳定表达人 TGR5 (CHO-TGR5 细胞)

[0208] 采用脂质体 2000 转染试剂, CHO 细胞被转染 3.8 μ g hTGR5 表达质粒 (pCMVSPORT6/hTGR5)、3.8 μ g CRE 驱动荧光素酶质粒 (PCRE-Luc) 和 0.4 μ g 新霉素抗性基因表达质粒转染 [pcDNA3.1(+)]。转染试剂选取 400 μ g/ml G418 硫酸盐, 单克隆分别培养在 96 孔板内, TGR5 表达 CHO 细胞株采用 LCA 处理筛选, 随即进行荧光素酶检测。

[0209] cAMP 生成分析

[0210] 依照厂商说明书, 在使用前, H716 细胞培养在涂有 0.75mg/ml Matrigel (BD

Biosciences) 96 孔板内, DMEM 内细胞密度为 6×10^4 个细胞 / 孔, DMEM 配有 10% (v/v) 胎牛血清、100units/ml 青霉素和 100 μ g 硫酸链霉素, 细胞孵育 24 小时, 这使得细胞粘附到板底。CHO-TGR5 细胞接培养在 96 孔板内, α -MEM 内细胞密度 3.5×10^4 个细胞 / 孔, α -MEM 辅以 10% (v/v) 胎牛血清、100 μ M NEAA、100units/ml 青霉素和 100 μ g 硫酸链霉素, 孵育 24 小时。将细胞用磷酸盐缓冲液清洗两次, 培养基交换成 cAMP 测定培养基 [DMEM 含有 0.1% (w/v) 的牛血清白蛋白和 0.5mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)]。37°C 下孵育 30 分钟后, 细胞采用含有每个化合物的新的 cAMP 测定培养基处理 30 分钟。治疗后, 培养基被丢掉, 依据制造商的说明书, 采用 cAMP 筛选试剂盒确定 cAMP 数量 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

[0211] 50%有效浓度 (EC50) 和药效测定

[0212] 检测在每个条件下进行三次或四次。采用机率值分析法确定 EC50 值。分别计算 TGR5 激动剂研究的 10 μ M LCA 值和 FXR 激动剂研究的 10 μ M 6 α -Et-CDCA 值的百分比确定药效。减去基本 (载体处理) 条件的平均值之后, 得到 EC50 和 / 或确定药效。转化为对数之后, 计算平均值 EC50 并比较不同化合物之间的 EC50 值。

[0213] 统计分析

[0214] 统计分析是由 t 检验完成并且 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

[0215] 实施例 3 饮食引起的肥胖小鼠模型中本发明化合物的代谢活性

[0216] 研究目的是确定是否 TGR5 激动剂 (齐墩果酸 (OA) 或本发明化合物 (举例来说, “测试化合物”)) 纠正肥胖和体内胰岛素抵抗的发展。为了检验这种可能性, OA/ 测试化合物通过食物给药对雄性 C57BL6J 大鼠施药 16 周, 大鼠之前接受高脂肪饮食。

[0217] II- 协议

[0218] 在之前的研究中, OA 作为选择性 TGR5 激动剂来观察, 没有造成食物厌恶。施用剂量为 100mg/kg/day 的 OA 的动物显示出一些毒性迹象, 然而低剂量的耐受性良好。因此, 这项研究中 OA 给药剂量为 50mg/kg/d。

[0219] 体外研究已确定本发明化合物为有效的并具有选择性的 TGR5 配体。预期本发明化合物没有毒性问题, 以 ~ 50 倍较低浓度给药。

[0220] 在这项研究中, 48 只雄性 C57BL6J 大鼠 (5 周龄) 分为两组: 24 只为一组 (第 1、2 和 3 组), 动物吃饲料, 而另外 24 只一组吃 10 周高脂肪饮食 (第 4、5 和 6 组)。在 16 周时然时分析这些动物。五组 10 只动物被分配如下:

[0221] 1: 饲料

[0222] 2: 饲料 + 50mg/kg/day OA

[0223] 3: 饲料 + 测试化合物如 30mg/kg/day

[0224] 4: 高脂肪饮食

[0225] 5: 高脂肪饮食 + 50mg/kg/day OA

[0226] 6: 高脂肪饮食 + 测试化合物如 30mg/kg/day

[0227] 在整个研究中, 体重和食物摄入量进行监测, 每周两次。

[0228] 第 2 周: 各组采用双能 X 线骨密度仪 (dexascan) 进行身体组成分析。

[0229] 第 1 周: 12 小时禁食时期之后, 测量各组的血清转氨酶水平、血糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和胰岛素, 按需要对大鼠喂食通常食物 (0

天)。

[0230] 第 2 周 :12 小时禁食时期之后,测量各组的血清转氨酶、血糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和胰岛素 (第 14 天)。

[0231] 第 4 周 :葡萄糖耐量是通过所有动物实施腹腔葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 来确定。此测试之前,动物禁食 12 小时。由间接测热法测量第 1、4、5 和 6 的夜间能量消耗 (饲料、高脂饮食和高脂肪饮食 0A/ 测试化合物)。

[0232] 第 8 周 :采用 dexascan 再次分析各组体重组。12 小时禁食时期之后,测量各组的血清转氨酶、血糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和胰岛素 (第 56 天)。

[0233] 第 9 周 :在 30 小时内研究第 4、5 和 6 组 (高脂饲料喂养小鼠) 昼夜活动节律。

[0234] 第 10 周 :测量第 4、5 和 6 组的血压和心率。

[0235] 第 11 周 :上午 10 时在室温下测量所有动物直肠温度。测量第 1、2、3 和 4 组的昼夜活动节律。

[0236] 第 12 周 :通过腹腔葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 分析第 4、5 和 6 组的葡萄糖耐量。在腹腔葡萄糖耐量试验期间,也收集血分析胰岛素水平。这些测试之前动物禁食 12 小时。24 小时后收集各组粪便并测量粪脂含量。

[0237] 第 16 周 :测量暴露于 4°C 下的所有动物的体温进行低温试验。

[0238] 三天后,动物被处死。处死时,收集血液并分析 :血脂 (胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、游离脂肪酸) ;肝功能 (谷丙转氨酶 (ALAT)、谷草转氨酶 (ASAT)、碱性酶、 γ -谷氨酰氨基转移酶 (γ -GT)) ;葡萄糖和胰岛素 ;选定组的血浆脂蛋白谱 (分子筛渗透层析仪)。

[0239] 收集肝脏、小肠、脂肪组织 (棕色脂肪组织及白色脂肪组织)、胰腺、心脏和肌肉,称重、保存进一步分析,包括 :标准组织学 (HE 染色、琥珀酸脱氢酶染色、油红 O 染色和细胞形态) ;组织脂肪含量 ;棕色脂肪组织和肌肉电子显微镜分析线粒体 ;通过定量 RT-PCR 检测, RNA 提取用于代谢和能量平衡中所选取的基因表达研究,蛋白质提取,用于研究翻译后修饰如蛋白质的乙酰化 (如 PGC-1 α)。

[0240] III- 详细过程

[0241] A- 动物的过程和饮食

[0242] 动物供给房屋和处置

[0243] 根据欧共体规定,大鼠 (5 只 / 笼) 在特定的无菌条件下群养 12 小时 :12 小时 (在 7 :00 开始) 光暗循环,温度 (20-22°C),湿度控制的动物饲养所。动物可以自由获得水和食物。

[0244] 饮用水

[0245] 在斯特拉斯堡市路易·巴斯德大学 Hydrologie 研究所定期分析自来水的化学成分,以确定没有潜在有毒物质。采用 HCl 和 HClO₄处理饮用水保持 pH 值在 5 至 5.5 之间,氯浓度在 5ppm 至 6ppm 之间。

[0246] 饮食

[0247] 标准啮齿动物饲料购自 UAR,高脂肪饮食购自 Research Diet。老鼠或者喂食饲料 (16%蛋白质、3%脂肪、5%纤维、5%灰分) 或者喂食高脂肪饮食 (20%蛋白质、20%碳水化

合物、60%脂肪)。齐墩果酸和测试化合物按照下列比例与粉末状饲料混合或者与粉末状高脂肪食物混合,比例如下:0.5克 OA/kg 的食物以 50mg/kg/day 治疗,0.08 克测试化合物/kg 食品以 10mg/kg/day 治疗。然后,再做成颗粒。对照组接受没有测试化合物或 OA 的食物颗粒。由于高脂肪食物的一致性,与 OA 混合不加水。饲料喂养的情况中,这是很难重新制作,少量的水被加入到粉末中重新做成颗粒,然后风干。每周准备一批新的食物。

[0248] 采血

[0249] 麻醉下眼眶取血或从尾部静脉取血。

[0250] 麻醉

[0251] 对于 DEXA 扫描实验,动物通过氯胺酮 (200mg/kg)/Xylazine (10mg/kg) 的混合物经腹腔注射给药被麻醉。对于静脉穿刺,动物吸入异氟醚 -O₂ 被麻醉。

[0252] B- 生物化学

[0253] 采用商业试剂 (奥林巴斯),使用奥林巴斯 AU-400 自动化实验室工作站进行这些测试。

[0254] 脂质和脂蛋白分析

[0255] 血清甘油三酯、总胆固醇和高密度脂蛋白经酶检测来确定。载脂蛋白 B 与磷钨酸/镁 (例如,罗氏诊断学,曼海姆,德国) 沉淀之后测定血清高密度脂蛋白胆固醇含量。按照供货商说明书,采用 Wako 试剂盒 (例如,诺伊斯,德国) 确定游离脂肪酸水平。

[0256] 代谢和内分泌探查

[0257] 使用 Medisense Precis 电极 (如 Abbot 实验室, Medisense 产品,贝德福德,美国),采用精密 Q. I. D 分析仪 (如 Medisense 系统) 测量血糖浓度。通过比较精密 QID 血糖测量仪数值与经典的血糖测量值,验证了该方法。选取精密 Q. I. D 方法是因为它需要最少的血并且能用于多次测量如腹腔葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 期间。根据制造商的说明书,经 ELISA 法检测血浆胰岛素 (如 Mercodia, 乌普萨拉,瑞典)。

[0258] C- 代谢试验

[0259] 脂蛋白谱

[0260] 分离三大类极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白及高密度脂蛋白,采用快速蛋白液相色谱仪得到脂蛋白谱。在大鼠身上进行腹腔葡萄糖耐量试验 (IPGTT) - 口服葡萄糖耐量试验 IPGTT,这些大鼠禁食过夜 (12 小时)。老鼠或者按体重 2g 葡萄糖/kg 的剂量腹腔注射 (IPGTT) 含 20% 葡萄糖的生理盐水 (0.9% 氯化钠) 溶液在体重的剂量。葡萄糖溶液给药之前和葡萄糖溶液给药后 15、30、45、75、90、120、150、180 分钟后,从尾部静脉采血,监测血糖及胰岛素。葡萄糖曲线增量面积被计算作为胰岛素敏感性的衡量,然而相应的胰岛素水平表明分泌胰岛素储备。

[0261] 能量消耗

[0262] 采用 OxyMax 仪器 (例如,哥伦布公司,哥伦布,俄亥俄州) 测量 12 小时内氧消耗量通过间接热量法评估能量消耗。该系统由进出塑料笼的空气开路组成 (每个笼子装一只老鼠)。动物可以自由获取食物和水。一种非常精确的二氧化碳和氧气传感器测量两个空气体积中氧气和二氧化碳的浓度差,得出给定时间内空气消耗量,进入笼子的空气流是恒定的。该仪器公布出来的数据是由连接的计算机中处理、分析并在可输出的 Excel 文件中显示出来。这些数值按 ml、kg⁻¹、h⁻¹ 表示,通常认为是 V_{O₂}。

[0263] DEXA 扫描测定身体脂肪含量

[0264] DEXA 分析在超高分辨率 PIXIMUS 系列密度仪 (0.18x 0.18mm 像素, 通用电气医疗系统, 麦迪逊, 威斯康星州, 美国) 上进行。骨矿物质密度 (BMD g/cm^3) 和使用 PIXIMUS 软件 (IAX 版本, 通用电气医疗系统) 测定身体成分。

[0265] D- 无创血压测量和脉搏

[0266] Visitech BP-2000 血压分析系统是一个计算机自动化尾动脉测压系统, 在没有操作者干涉的情况下该系统用于同时测量 4 只清醒的小鼠。加热平台上放置暗箱, 老鼠放置在单个暗室内, 其尾部深入尾动脉测压系统。该系统通过测定套囊内压来测量血压, 套囊内压阻断尾部血流。光电传感器检测待测动物的脉搏。系统得到结果, 显示密切符合同时在颈动脉测量的平均动脉内压力。可得到心脏收缩压的重复值及心跳值。这需要在该系统中培训动物一个星期。

[0267] E- 昼夜节律

[0268] 采用各自箱子测量自发运动, 箱子由滑动板、可拆卸的笼子组成, 并装备有红外线捕捉器, 测量移动活动和直立。盒子使用电子接口连接到一台计算机上 (例如, Imetronic, 佩萨克, 法国)。老鼠测试 32 小时, 以测量其对装置的适应以及昼夜活动。测试期间, 采用自动测舔仪测量水的消耗量。

[0269] 实施例 4. 物理化学性质

[0270] 水中的溶解度

[0271] 固体化合物 (BA) 悬浮在 5ml 的 0.1M HCl 中。孵育 1 周后, 饱和溶液经微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤, 采用 C18 液相色谱柱, 经高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱联用技术测量 BA 浓度 (150 毫米 x 2 毫米 i. d., 4 μm) 和含有 15mM 乙酸 ($\text{pH} = 5$) 和乙腈的水作为流动相。流速为 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。该收购进行质谱在多反应监测中使用负离子喷雾源代码模式。水溶性记为 $\mu\text{mol}/\text{升}$ 。采用负离子化离子源, 多反应监测模式中执行质谱条件。水溶性记为 $\mu\text{mol}/\text{升}$ 。

[0272] 水溶性测定 $\text{pH} = 1$ 的不溶性羧基胆汁酸质子化产物。磺酸盐化合物和硫酸盐化合物 3A 和 2A 在低 pH 值下离子化, 在生理条件下在所有体液中总是可溶的。

[0273] 表 2 : 所研究的类似物和天然 BA 的物理化学性质

[0274]

胆酸	$W_s^{(a)}$ (μM)	CMC(b) 0,15M Na^+ (mM)	$ST_{\text{CMC}}^{(c)}$ Dyne/cm	$\text{Log}P_{\text{A-}}$ (d)	白蛋白结 合 ^(e) (%)
CDCA	32	3.2	45.5	2.2	93
UDCA	7.5	6.0	50.5	2.2	94
CA	273*	11*	-	1.1*	50*
TCDCA	高度可溶	3.0*	-	0.9*	70*
TUDCA	高度可溶	2.2*	-	1.1*	67*
6MUDCA	2.8*	4.2*		1.3*	80*
3A	高度可溶	2.8	43.4	0.7	81
2A	高度可溶	不可用	不可用	2.3	97

[0275] ^a W_s :水溶性是指质子化产物 BA, 因此不评估高度可溶 (hs) 的 3A、2A、TCDCA、和 TUDCA。

[0276] ^bCMC :测定 0, 15M 氯化钠水溶液的临界胶束浓度。

[0277] ^cST CMC :0, 15M 氯化钠水溶液中临界胶束浓度表面张力。

[0278] ^dLogPA :所研究的离子化产物的胆汁酸的 1- 辛醇 - 水分配系数。

[0279] * :来自文献中的数值。

[0280] 临界胶束浓度 (CMC)

[0281] 去污力, 例如易于形成胶束, 带电荷分子, 作为钠盐 (高于 pKa 值 2 个单位) 在水中可溶。采用最大泡压法通过测定表面张力 (ST) 确定临界胶束浓度 (CMC), 最大泡压法给出的表面张力值稍微受到潜在杂质的影响, 静态方法测量。张力计是 Sensadyne 6000 (Chem-Dyne Research Corp., 密尔沃基, 威斯康星州), 装有两个 0.5 和 4.0mm 直径的玻璃探针, 并连接到氮源配备上。气泡生成频率为 26°C 蒸馏水中 1 个气泡 / 秒 ($P = 2.7\text{atm}$), 校准是采用重蒸馏水和甲醇校准。在 0.13-50mM 范围内不同浓度下测量 0.15M 氯化钠中的 BA 钠盐溶液表面张力。表面张力值针对胆汁盐浓度的对数绘制; 采用最小二乘法计算对应于两部分曲线的回归线 (单体和胶束相), 曲线的交点为临界胶束浓度。从表面张力与浓度曲线来看, 根据所给去污力的信息计算临界胶束浓度的表面张力 (单体和多聚体之间的平衡), 去污力与胶束尺寸有关, 而胶束尺寸与降低表面张力能力有关。

[0282] 非平衡条件下, 例如杂质轻微影响表面张力结果, 经表面张力测量评价临界胶束浓度 (图 1)。化合物 3A 提供了降低临界胶束浓度 2.8mM 的高表面张力。该表面张力与浓度的行为特性表明相对大团聚物的形成与去污力具有一致性。

[0283] 辛醇 / 水分配系数

[0284] 由于硫酸盐和磺酸盐类似物总是在各 pH 值下离子化, 辛醇 / 水分配系数测量所有离子化分子。采用传统的摇瓶方法评价 1- 辛醇 / 水分配系数 ($\log P$)。在 pH = 8 采用 0.1M 磷酸缓冲液缓冲 0.1mM 胆汁盐溶液, 以确保 BA 完全离子化; $\log P$ 值是指离子化的 BA, 而不

是质子化产物,每个 BA 的初始浓度低于其各自的 CMC 值。5ml 的 1-辛醇预饱和缓冲水溶液被加入,样品在室温连续搅拌状态下放置平衡 2 周。离心后,仔细分离两相。采用 C18 液相色谱柱,经高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱联用技术测量水相中 BA 浓度(150 毫米 x 2 毫米 i. d., 4 μ m),含有 15mM 乙酸(pH = 5)和乙腈的水作为流动相。流速为 150 μ l/min,柱温为 45 $^{\circ}$ C。采用负离子化离子源,多反应监测模式中执行质谱条件。

[0285] 既然后者甚至在非常低的 pH 值下不进行质子化,1-辛醇/水分配系数计算离子化产物,方便羧酸和硫酸盐化胆汁酸之间的比较。

[0286] 白蛋白结合

[0287] 固定的白蛋白比例下,平衡透析评价白蛋白结合的程度。BA 溶解在浓度为 100 μ m 的 5%牛血清白蛋白溶液中(pH 值 7.2),25 $^{\circ}$ C 下静置 24 个小时。2ml 溶液在纤维素囊透析,这种纤维素囊具有 12-14,000 分子量截留,截留 25ml 生理盐水。25 $^{\circ}$ C 下轻微机械摇晃 72 小时平衡该系统。采用高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱联用技术在前述分析条件下测量透析溶液(对应于游离分数)和起始溶液的 BA 浓度。白蛋白结合百分数从初始 BA 浓度和游离分数未结合浓度中计算得出。数据如表 2 所示。不过,所有化合物出现了与相对快的肝摄取兼容的白蛋白结合,类似于天然 BA。因此,预期肝脏摄取不同的动力学(减慢)。

[0288] 实施例 5. 人类粪便培养物体外代谢稳定性

[0289] 肠道细菌稳定性

[0290] 7a-脱羟基化作用

[0291] 500mg 均质新鲜人类粪便被转移到无菌小瓶内,加入 5mL 消毒碎肉-葡萄糖培养基(斯科特实验室,菲斯克维尔,RI)。然后,加入 BA 至最终浓度为 0.05mM。加入 BA 后,小瓶在 37 $^{\circ}$ C 孵育 0 小时、1 小时、2 小时、4 小时、8 小时和 24 小时,使用 150 μ L 30%氢氧化钾终止反应。在 3500rpm 对样品离心 10 分钟;C18 固相萃取并从上清液液中,BA 经 C-18 固相萃取从上清液中分离出来,并采用薄层色谱和高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱联用技术进行分析。

[0292] 薄层色谱(TLC),利用硅胶 0.25mm 厚度板(默克, Darmstat, 德国),被用作第一组筛选试验。用于共轭 BA 分离的溶剂系统是由丙酸/乙酸异戊酯/水/正丙醇组成(3 : 4 : 1 : 2, v/v/v/v; 溶剂 I),而用于共轭 BA 分离的溶剂系统是由乙酸/四氯化碳/异丙醚/乙酸异戊酯/水/正丙醇/苯组成(1 : 4 : 6 : 8 : 2 : 2, v/v/v/v/v/v; 溶剂 II)。采用 5%磷钼酸乙醇溶液使分离出来的 BA 显色。

[0293] 所有研究的类似物在人类粪便培养基培养时都是非常稳定的,并且甚至在 24 小时后,超过 85%的化合物可以回收未改性,如图 2 报道的。反之,参照天然类似物鹅脱氧胆酸提供了至少一个小时的半衰期,孵育 8 小时之后,几乎被完全代谢(7-脱羟基化),形成石胆酸。所有 6 种乙基类似物孵育很长时间之后,7-脱羟基化反应和 7 氧代衍生物的中间过程实际上被取消。

[0294] 侧链稳定性

[0295] 根据第一组结果,侧链不被肠内细菌酶活性改性。这些数据表明,在 6 位的乙基保护 7 羟基不被氧化或者去除空间位阻。此外,所有的类似物侧链新陈代谢也非常稳定。硫酸盐化类似物 2A 的侧链酯键在人类粪便培养基中是相当稳定的。磺酸盐化类似物 3A 也是很稳定。高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱联用技术没有发现代谢。这些数据表明,

在肠道内较低的厌氧细菌含量中,这些类似物是稳定的。

[0296] 实施例 6. 体外模拟十二指肠液 / 胰腺液体代谢稳定性 (美国药典标准)

[0297] 这项研究已针对化合物 2A,因为它包含一个侧链酯键,其目的是要证实存在于十二指肠液 / 胰腺液体内的酯酶存在的稳定性。模拟胰腺液体是由 10g/L 胰酶 (Sigma 公司 P8096 :猪胰腺胰酶,1x USP specifications) 溶解在 0.05M 磷酸盐缓冲溶液制得, pH = 7.2 ± 0.1。然后,4ml 等份的模拟胰腺液体中加入 50pM 所研究的 BA,37°C 下孵育不同时间 (0、30、60、90、120、180 和 240 分钟)。孵育之后,2ml 等份的每种溶液中被加入 2mL 0.1M NaOH,采用固相萃取法进行胆汁萃取并且经如上所述薄层色谱和质谱分析。图 2 显示了 2A 在模拟胰腺液体中的代谢稳定性。橄榄油被用来作为如美国药典标准协议中报告的参照物。该化合物是非常稳定 (参见图 2) 和化合物 2A 中的酯键 (硫酸盐) 在胰酯酶作用下未水解,表明人十二指肠和肠上部内容物中具有高稳定性。

[0298] 实施例 7. 十二指肠 (id) 和股动脉 (iv) 给药后胆汁 - 瘦老鼠化合物 3A 的胆汁分泌和代谢

[0299] 目的和基本原理

[0300] 动脉新的类似物的结构修饰可能会影响到其肝脏吸收、肝脏运输和肝脏分泌以及肠道的吸收。因此,股动脉 (iv) 和十二指肠 (id) 一起给药后,其新陈代谢是进一步研究后选的关键点。

[0301] 为了评估肠道吸收的模式和效率,类似物均以相同剂量静脉注射 (股动脉输液) 和口服 (十二指肠灌注) 给药,胆瘦大鼠模型评价胆汁分泌率。股动脉 (iv) 和十二指肠 (id) 给药之间的胆汁分泌与时间曲线的面积差因为肠道吸收,给出其生物利用度信息。

[0302] 利胆作用

[0303] - 十二指肠灌注

[0304] 胆汁瘦大鼠模型由博洛尼亚大学实验室开发。该化合物 3A 十二指肠灌注以 1 μ mol/kg/min (1 小时的灌注) 对老鼠组给药。在灌注之前和之后,不同时间收集老鼠胆瘦的胆汁样品。十二指肠灌注试验,3 只老鼠接受 (250 ± 10g) 治疗。胆汁每 15 分钟采集一次,连续 4 个小时。此外,在时间和采样 (十二指肠对照组老鼠) 的相同条件下,3 组对照组分别用生理盐水治疗。

[0305] 图 3 显示样品采集中 (一个动物) 胆汁流量。开始十二指肠灌注,30 分钟基线后收集胆汁,持续 1 小时。化合物 3A 提供了一个温和的利胆作用。

[0306] - 静脉输液

[0307] 股动脉灌注试验,3 只老鼠接受治疗。图 4 显示研究期间的胆汁流量。75 分钟稳态后开始股动脉灌注,进行 60 分钟。胆汁每 15 分钟采集一次,连续 4 个小时。此外,在时间和采样 (股动脉对照组老鼠) 的相同条件下,3 组对照组分别用生理盐水治疗。

[0308] 化合物 3A 提供了一个温和的利胆作用,类似于十二指肠灌注实验中得出的利胆作用。

[0309] 类似物给药的胆汁分泌

[0310] 股动脉 (iv) 和十二指肠 (id) 试验期间收集胆汁样品进行分析,以确定类似物给药的胆汁分泌及其代谢产物。

[0311] 高效液相色谱 - 电喷雾离子化串联质谱联用技术分析。制备含有每种化合物的

1mmol/L 甲醇的储备液 (UPF 1212350 $\mu\text{mol/L}$ 除外), 主要溶液稀释适当体积制备工作液。甲醇和乙腈是 HPLC 级纯度。氨水纯度为 30% 和醋酸纯度为 99.8%。所有试剂均购自 Carlo 化学试剂。HPLC 级水由 Milli-Q 系统制备得到。

[0312] 样品制备

[0313] 老鼠胆汁样本放置于室温下, 简单搅拌, 并且用 15ml 醋酸铵稀释液 ($\text{pH} = 5.0$): 乙腈 = 70 : 30 稀释 1 : 100v/v (十二指肠灌注的胆汁样品) 和 1 : 100 或 1 : 200v/v (股动脉灌注的胆汁样本)。

[0314] 最终溶液转移进自动进样瓶内和 10 μL 注入到色谱柱内。

[0315] 高压液相色谱 - 电喷雾质谱 / 质谱方法

[0316] 采用负离子模式电雾 (ESI) 源经液相色谱 - 串联质谱法分析大鼠胆汁样品。对于液相色谱法, 液相色谱仪 (Waters Alliance2695) 分离模块联合自动进样器使用。自动进样器维持在 7°C 下。分离在 Synergi Hydro-RP C18 柱 (150x 2.0mm i. d., 4 μm 颗粒大小) 上进行, 受到 Security Guard ODS 4x 2.0mm i. d. 预柱保护, 都购自 Phenomenex。分析物经作为流动相 A 的 15mM 醋酸铵缓冲液 ($\text{pH} = 5.00$) 和作为流动相 B 的乙腈洗脱。流动相 B 在 10 分钟内从 30% 提高到 64%, 保持恒定 10 分钟。流速为 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, 柱温为 45°C。洗脱液引入电雾源, 电雾源连接三重四极杆质谱系统 (MRM) 采集模式电喷雾源连接到三重四级质谱仪 (Quattro-LC, Micromass), 在多反应监测 (MRM) 采集模式下操作。氮气用作雾化气, 流速为 90L/h, 作为脱溶剂气体, 流速为 930L/h。离子源块和脱溶剂温度分别设定分别 80°C 和 180°C。毛细管电压为 3.0 千伏。4.0 版本 MassLynx 软件用于数据采集和处理。此外, 在单一质谱法或串联质谱 / 质谱法配置试验中采用质谱仪确定代谢物。

[0317] 量化

[0318] 5 点校准曲线每天都绘制, 并两份进样。校准样品浓度范围在流动相中 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 至 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。使用最小二乘回归分析, 从分析物浓度与分析物峰面积建立曲线关系中获得线性校准曲线参数, ($\text{weight} = 1/x^2$)。相关系数 ≥ 0.989 。

[0319] 类似物给药的药代动力学 (胆汁分泌): 十二指肠 (id) vs. 股动脉 (iv) 对比

[0320] 数据是指以剂量 1 $\mu\text{mol}/\text{Kg}/\text{min}$ 进行十二指肠和股动脉灌注之后胆汁中回收的类似物的分泌速率。主要和次要的代谢产物以后进行报道。表 3 显示十二指肠灌注过程中采集的老鼠样品 (1 小时, 从 75 至 135 分钟), 化合物 3A 浓度和胆汁中得到的分泌值。表 4 显示股动脉灌注过程中采集的老鼠样品 (1 小时, 从 75 至 135 分钟), 化合物 3A 浓度和胆汁分泌值。

[0321] 表 3.

[0322]

时间 (分钟)	3A	
	浓度 (mmol/L)	分泌 ($\mu\text{mol/kg/min}$)
90	n.d. ^b	- ^a
120	0.37	0.026
150	0.90	0.079
180	1.3	0.101
210	0.95	0.061
240	0.70	0.043
270	0.58	0.039
300	0.51	0.029

[0323] ^a- :未计算 ^bn. d. :未检测

[0324] 表 4.

[0325]

时间 (分钟)	3A	
	浓度 (mmol/L)	分泌 ($\mu\text{mol/kg/min}$)
75	n.d. ^b	- ^a
90	2.6	0.105
120	7.3	0.588
150	7.5	0.463
180	6.2	0.363
210	3.4	0.247
240	1	0.045

[0326] ^a- :未计算 ^bn. d. :未检测

[0327] 股动脉给药后, 化合物 3A(磺酸盐化类似物) 胆汁分泌是非常有效的, 化合物在胆汁中几乎完全回收。动力学特点表明类似物有效地被肝脏吸收, 并由胆汁分泌出来, 几乎无肝脏代谢(图 5)。相反, 十二指肠给药之后, 胆汁中的回收远低于股动脉给药后的胆汁中的回收, 表明该化合物是肠道很难吸收(图 5)。根据物理化学性质, 该化合物被动扩散机制很难吸收(低 $\text{LogP} = 0.71$) 和作用机制似乎并没有参与。三羟基的存在致使一侧的分子有效地被肝脏吸收并分泌进入胆汁, 但在另一例的分子很难被肠道吸收。

[0328] 实施例 8. 肝脏代谢

[0329] 进行初步筛选,根据以前的实验和数据以及所研究的类似物的结构和物理化学性质,基于预期化合物,搜索可能的代谢产物。

[0330] 化合物 3A 不是由肝脏或肠道代谢,一旦由肝脏吸收,化合物 3A 分泌在胆汁中,未经快速动力学修饰,在肝脏短时间停留。当经十二指肠给药时,很难被肠道吸收,此情况下不能被代谢。由于其相对较高的亲水性(低 LogP)以及磺酸基团和三羟基的存在,化合物 3A 具有足够极性被分泌在胆汁中,但化合物 3A 的极性太大要被肠道被动吸收。图 6 显示 di 试验中采用质谱鉴定化合物 3A 和其在胆汁中主要代谢物。数据报告为绝对面积值。图 7 是图 6 的缩放图。

[0331] 实施例 9. HepG2 细胞化合物体外毒性测试

[0332] 采用本领域周知的标准方法,评价了本发明的化合物的细胞毒作用。具体来说,采用 HepG2 细胞,监测 ATP 的下降,确定监测的 EC50 值,评价细胞毒作用。化合物 3A 和 2A 都显示出 EC50 > 1000mM。

[0333]

化合物	HepG2 细胞毒性作用 ATP 降低 EC50 (μ M)
星孢菌素	15
它莫西芬 (tamoxifen)	47
LCA	84
CDCA	650
UDCA	>1000
CA	>1000
3A	>1000
2A	>1000

[0334] 实施例 10. NR 选择性检测

[0335] 使用本领域已知的检测方法,对本发明化合物的选择性进行评价。具体来说,以下检测方法被采用:

[0336] FXR 和 LXR :共激活因子募集 (alphascreen) ;

[0337] TGR5 :人体肠道细胞株 (NCI-H716) cAMP 水平 ;

[0338] PXR 的 :配体竞争试验 (结合试验)

[0339] CAR :共激活因子募集 (Lanthascreen)

[0340]

化合物 (参照 标准)	FXR(CDCA= 10-20 μ M) EC50(μ M)	TGR5(LCA = 4-8 μ M) EC50(μ M)	LXR α (T0901317= 0,08 μ M) EC50(μ M)	PXR (SR-12183= 0,013 μ M) EC50(μ M)	CAR (CITCO= 0.005 μ M) EC50(μ M)	PPAR δ (0,004 μ M) EC50(μ M)	VDR (0,005 μ M) EC50(μ M)
CDCA	20	30	非活性 (No activity)	>250	>250	非活性	非活性
LCA	非活性	4-8	非活性	23	非活性	非活性	非活性
CA	非活性	30	非活性	非活性	非活性	非活性	非活性
UDCA	>250	非活性	非活性	>250	>250	非活性	非活性
2A	0.14	1.6	非活性	21	84	非活性	非活性
3A	7	0.7	非活性	150	>250	非活性	非活性

[0341] 实施例 11:饮食诱导的肥胖小鼠模型中化合物 3A 的代谢活性

[0342] 这项研究的目的是评估饮食诱导的肥胖小鼠模型中化合物 3A 的治疗功效。化合物 3A 对雄性 C57BL6J 老鼠经过食物给药 16 周,雄性 C57BL6J 老鼠之前经过 10 周高脂肪的饮食。

[0343] II- 协议

[0344] 这项研究进行化合物 3A 给药。

[0345] 在这项研究中,雄性 C57BL6J 小鼠 (5 周龄) 随机分为 2 组:一组动物接受饲料饮食以控制肥胖的发生,一组动物接受高脂肪的饮食。测试对接受高脂饮食 (高脂) 的动物身上的化合物 3A。然后在 13 周的时间内对这些动物进行分析。各组分别如下:

[0346] 1:饲料

[0347] 2:高脂肪饮食

[0348] 3:高脂肪饮食 + 化合物 3A

[0349] 在整个研究中,每周两次监测体重和食物摄入量。肥胖开始的周期为 10 周。在 10 周末期,使用双能 X 线骨密度仪 (dexascan) 分析身体成分和血清转氨酶水平、血糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和胰岛素。

[0350] 1 周后:进行化合物给药。

[0351] 3 周后:采血。测量禁食 12 小时后所有组动物的血清转氨酶水平、血糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和胰岛素。

[0352] 2 周后:采用 dexascan 再次所有组动物的分析体重成分。

[0353] 2 周后:由间接测热法和活动监测仪测量夜间能量消耗。

[0354] 2 周后:所有动物进行腹腔葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 确定葡萄糖耐量。这个测试之前动物禁食 12 小时。

[0355] 2 周后:动物被处死。处死时,收集血液并分析:血脂 (胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、游离脂肪酸);肝功能 (谷丙转氨酶 (ALAT)、谷草转氨酶 (ASAT)、碱性酶、 γ -谷氨酰氨基转移酶 (γ -GT));葡萄糖和胰岛素;选定组的血浆脂蛋白谱 (分子筛渗透层析仪)。

[0356] 收集肝脏、小肠、脂肪组织 (棕色脂肪组织及白色脂肪组织)、胰腺、心脏和肌肉,

称重、保存进一步分析,包括:标准组织学(HE染色、琥珀酸脱氢酶染色、油红O染色和细胞形态);组织脂肪含量;棕色脂肪组织和肌肉电子显微镜分析线粒体;通过定量RT-PCR检测, RNA提取用于代谢和能量平衡中所选取的基因表达研究,蛋白质提取,用于研究翻译后修饰如蛋白质的乙酰化(如PGC-1 α)。

[0357] III- 详细过程

[0358] A- 动物的过程和饮食

[0359] 动物供给房屋和处置

[0360] 根据欧共体规定,小鼠(5只/笼)在特定的无病菌条件下群养12小时:12小时(在7:00开始)光暗循环,温度(20-22 $^{\circ}$ C),湿度控制的动物饲养所。动物可以自由获得水和食物。

[0361] 饮用水

[0362] 在斯特拉斯堡市路易·巴斯德大学Hydrologie研究所定期分析自来水的化学成分,以确定没有潜在有毒物质。采用HCl和HClO₄处理饮用水保持pH值在5至5.5之间,氯浓度在5ppm至6ppm之间。

[0363] 饮食

[0364] 标准啮齿动物饲料购自UAR,高脂肪饮食购自Research Diet。老鼠或者喂食饲料(16%蛋白质、3%脂肪、5%纤维、5%灰分)或者喂食高脂肪饮食(20%蛋白质、20%碳水化合物、60%脂肪)。化合物3A与粉末状高脂肪食物混合。然后,再做成颗粒。高脂肪饮食对照组接受没有化合物3A的食物颗粒。由于高脂肪食物的一致性,与0A混合不加水。饲料喂养的情况中,这是很难重复,少量的水被加入到粉末中重新做成颗粒,然后风干。每周准备一批新的食物。

[0365] 采血

[0366] 麻醉下眼眶取血或从尾部静脉取血。

[0367] 麻醉

[0368] 对于DEXA扫描实验,动物通过氯胺酮(200mg/kg)/Xylazine(10mg/kg)的混合物经腹腔注射给药被麻醉。对于静脉穿刺,动物吸入异氟醚-O₂混合物被麻醉。

[0369] B- 生物化学

[0370] 采用商业试剂(奥林巴斯),使用奥林巴斯AU-400自动化实验室工作站进行这些测试。

[0371] 脂质和脂蛋白分析

[0372] 血清甘油三酯、总胆固醇和高密度脂蛋白经酶检测来确定。载脂蛋白B与磷钨酸/镁(例如,罗氏诊断学,曼海姆,德国)沉淀之后测定血清高密度脂蛋白胆固醇含量。按照供货商说明书,采用Wako试剂盒(例如,诺伊斯,德国)确定游离脂肪酸水平。

[0373] 代谢和内分泌探查

[0374] 使用Medisense Precis电极(如Abbot实验室,Medisense产品,贝德福德,美国),采用精密Q.I.D分析仪(如Medisense系统)测量血糖浓度。通过比较精密QID血糖测量仪数值与经典的血糖测量值,验证了该方法。选取精密Q.I.D方法是因为它需要最少的血并且能用于多次测量如腹腔葡萄糖耐量试验(IPGTT)期间。根据制造商的说明书,经ELISA法检测血浆胰岛素(如Mercodia,乌普萨拉,瑞典)。

[0375] C- 代谢试验**[0376] 脂蛋白谱**

[0377] 分离三大类极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白及高密度脂蛋白,采用快速蛋白液相色谱仪得到脂蛋白谱。在小鼠身上进行腹腔葡萄糖耐量试验 (IPGTT)-口服葡萄糖耐量试验 IPGTT,这些小鼠禁食过夜 (12 小时)。老鼠或者按体重 2g 葡萄糖 /kg 的剂量腹腔注射 (IPGTT) 含 20%葡萄糖的生理盐水 (0.9%氯化钠) 溶液在体重的剂量。葡萄糖溶液给药之前和葡萄糖溶液给药后 15、30、45、75、90、120、150、180 分钟后,从尾部静脉采血,监测血糖及胰岛素。葡萄糖曲线增量面积被计算作为胰岛素敏感性的衡量,然而相应的胰岛素水平表明分泌胰岛素储备。

[0378] 能量消耗

[0379] 采用 Oxymax 仪器 (例如,哥伦布公司,哥伦布,俄亥俄州) 测量 12 小时内氧消耗量通过间接热量法评估能量消耗。该系统由进出塑料笼的空气开路组成 (每个笼子装一只老鼠)。动物可以自由获取食物和水。一种非常精确的二氧化碳和氧气传感器测量两个空气体积中氧气和二氧化碳的浓度差,得出给定时间内空气消耗量,进入笼子的空气流是恒定的。仪器公布出来的数据是由连接的计算机中处理、分析并在可输出的 Excel 文件中显示出来。这些数值按 $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 表示,通常认为是 VO_2 。

[0380] DEXA 扫描测定身体脂肪含量

[0381] DEXA 分析在超高分辨率 PIXIMUS 系列密度仪 (0.18x 0.18mm 像素,通用电气医疗系统,麦迪逊,威斯康星州,美国) 上进行。骨矿物质密度 (BMD g/cm^3) 和使用 PIXIMUS 软件 (1.4x 版本,通用电气医疗系统) 测定身体成分。

[0382] D- 无创血压测量和脉搏

[0383] Visitech BP-2000 血压分析系统是一个计算机自动化尾动脉测压系统,在没有操作者干涉的情况下该系统用于同时测量 4 只清醒的小鼠。加热平台上放置暗箱,老鼠放置在单个暗室内,其尾部深入尾动脉测压系统。该系统通过测定套囊内压来测量血压,套囊内压阻断尾部血流。光电传感器检测待测动物的脉搏。系统得到结果,显示密切符合同时在颈动脉测量的平均动脉内压力。可得到心脏收缩压的重复值及心跳值。这需要在该系统中培训动物一个星期。

[0384] E- 昼夜节律

[0385] 采用各自箱子测量自发运动,箱子由滑动板、可拆卸的笼子组成,并装备有红外线捕捉器,测量移动活动和直立。盒子使用电子接口连接到一台计算机上 (例如,Imetronic,佩萨克,法国)。老鼠测试 32 个小时,以测量其对装置的适应以及昼夜活动。测试期间,采用自动测舔仪测量水的消耗量。

[0386] 这项研究的结果如图 8、9、10 所示。图 8 显示治疗后重量增长变化 (%)。曲线显示重量增长 % (0、5、10、15、20、25) 与时间 (0-9 周) 的关系。进行化合物 3A 治疗的高脂肪进食老鼠体重增长减弱。图 9 显示治疗 5 周 (%) 后身体成分的变化。体重增加 % 的曲线显示为肥胖、消瘦和体液测量。经过高脂肪饮食,化合物 3A 减少脂肪增加。图 10 显示化合物 3A 治疗的葡萄糖平衡的评估。图 10A 显示治疗后 3 周的糖血症。尤其,图 10A 是一种条形图,对比 3 组老鼠 (x 轴):高脂肪喂食化合物 3A 给药的老鼠 (第一组条线),高脂肪喂食老鼠 (第二组条线),饲料喂食的老鼠 (第三组条线),它们的空腹高血糖 (y 轴) 10、12、

14、16、18、20、和 22mmol/l。图 10B 显示治疗后 3 周的血清果糖胺。尤其，图 10B 是一种条线图，对比 3 组老鼠 (x 轴)：高脂肪喂食并且化合物 3A 给药的老鼠 (第一组条线)，高脂肪喂食老鼠 (第二组条线)，饲料喂食的老鼠 (第三组条线)，它们的血清果糖胺 (y 轴) 170、175、180、185、195、200、205、和 210 微摩尔。图 10C 显示治疗后 9 周葡萄糖耐量检测。尤其，图 10C 是一条曲线，对比 3 组老鼠：高脂肪喂食化合物 3A 给药的老鼠，高脂肪喂食老鼠，饲料喂食的老鼠。y 轴显示用量 0、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500mg/dL。x 轴显示时间 0、30、60、90、120、150、和 180 分钟。

[0387] 其他实施方案

[0388] 虽然对本发明结合其具体实施例进行了描述，前述旨在说明，而不是限制由附上的权利要求的范围界定的本发明的范围。其他的方面、优势和修改都在本申请的权利要求范围之内。本领域的技术人员应明白，可以在不背离附上的权利要求所涵盖的本发明的范围的情况下对于实施形式和细节进行多种变化。

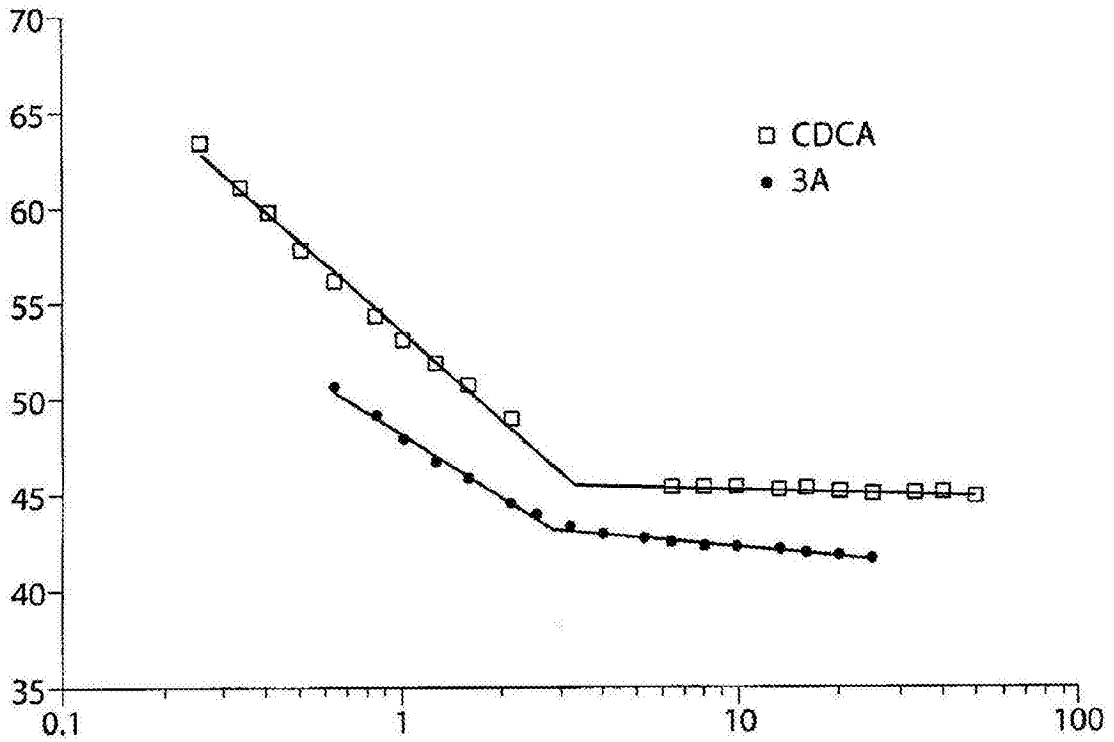


图 1

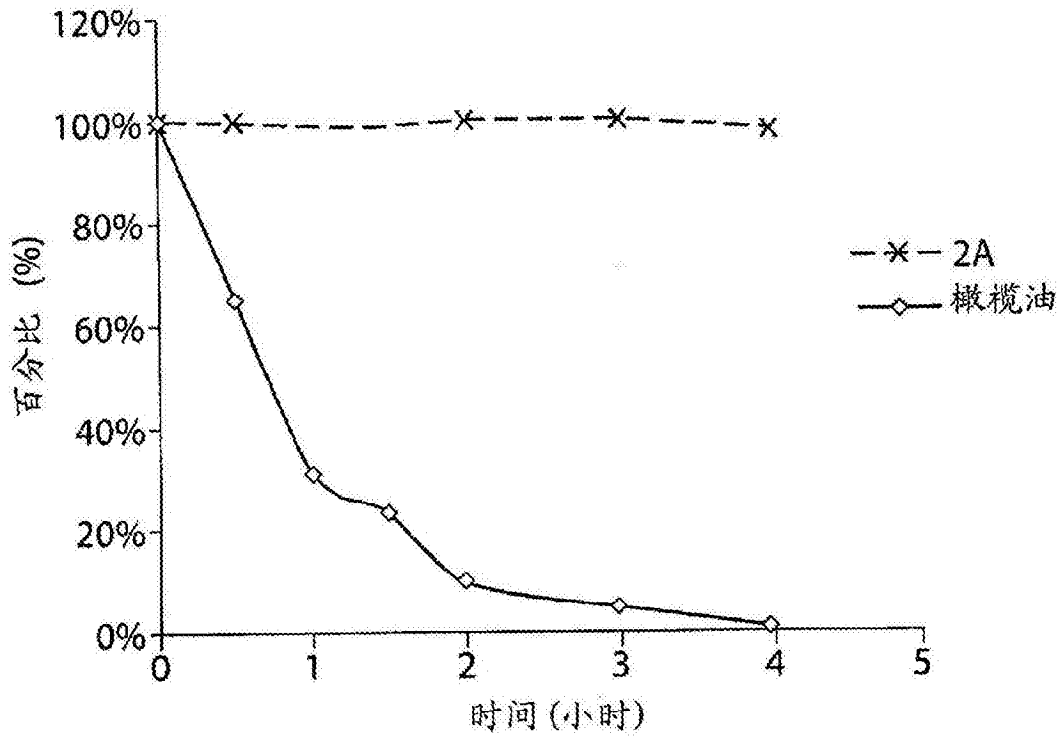


图 2

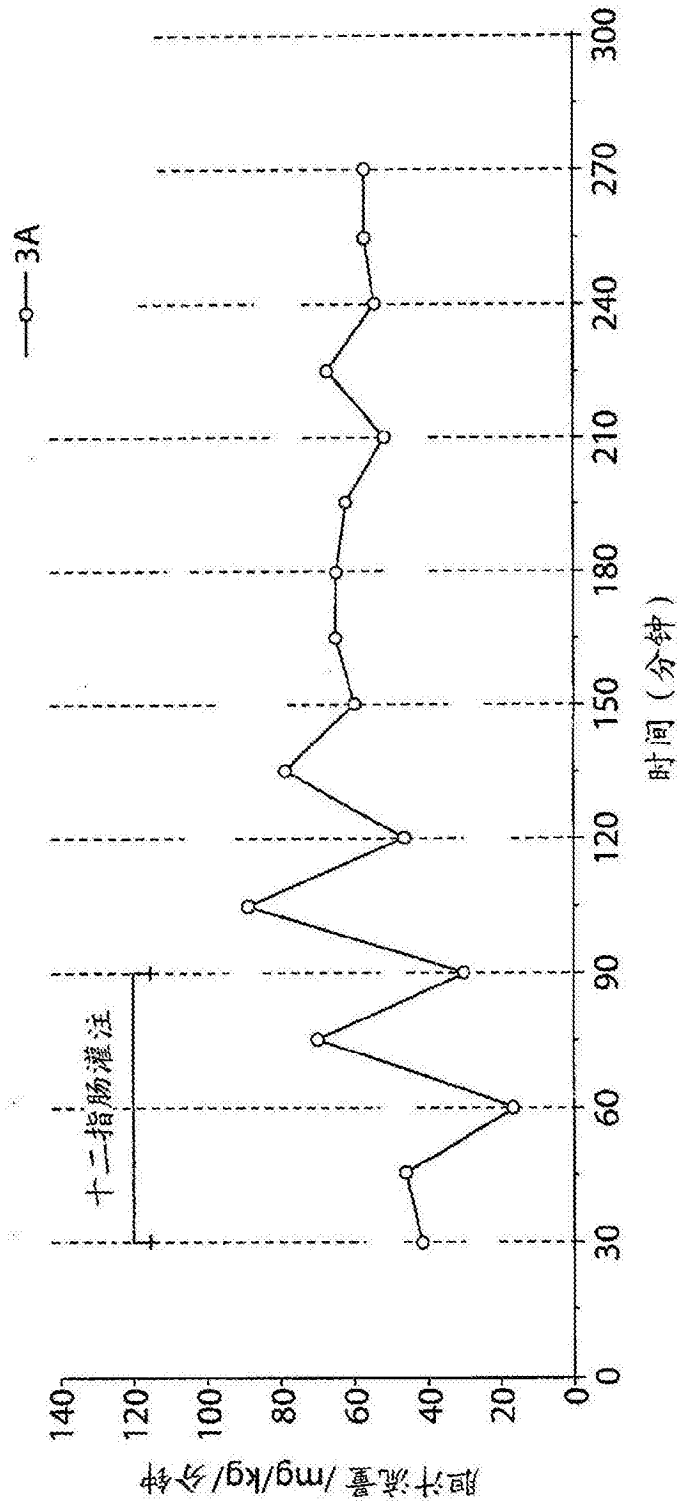


图 3

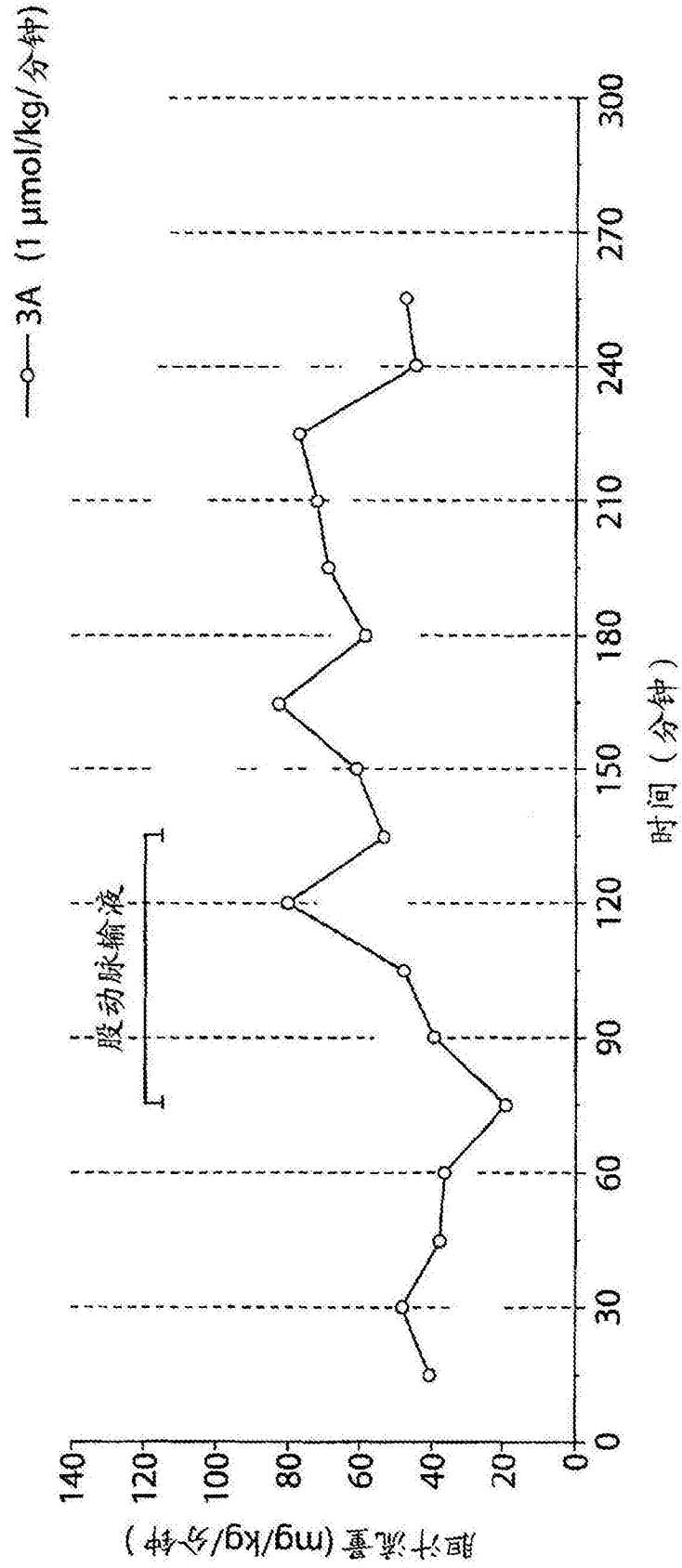


图 4

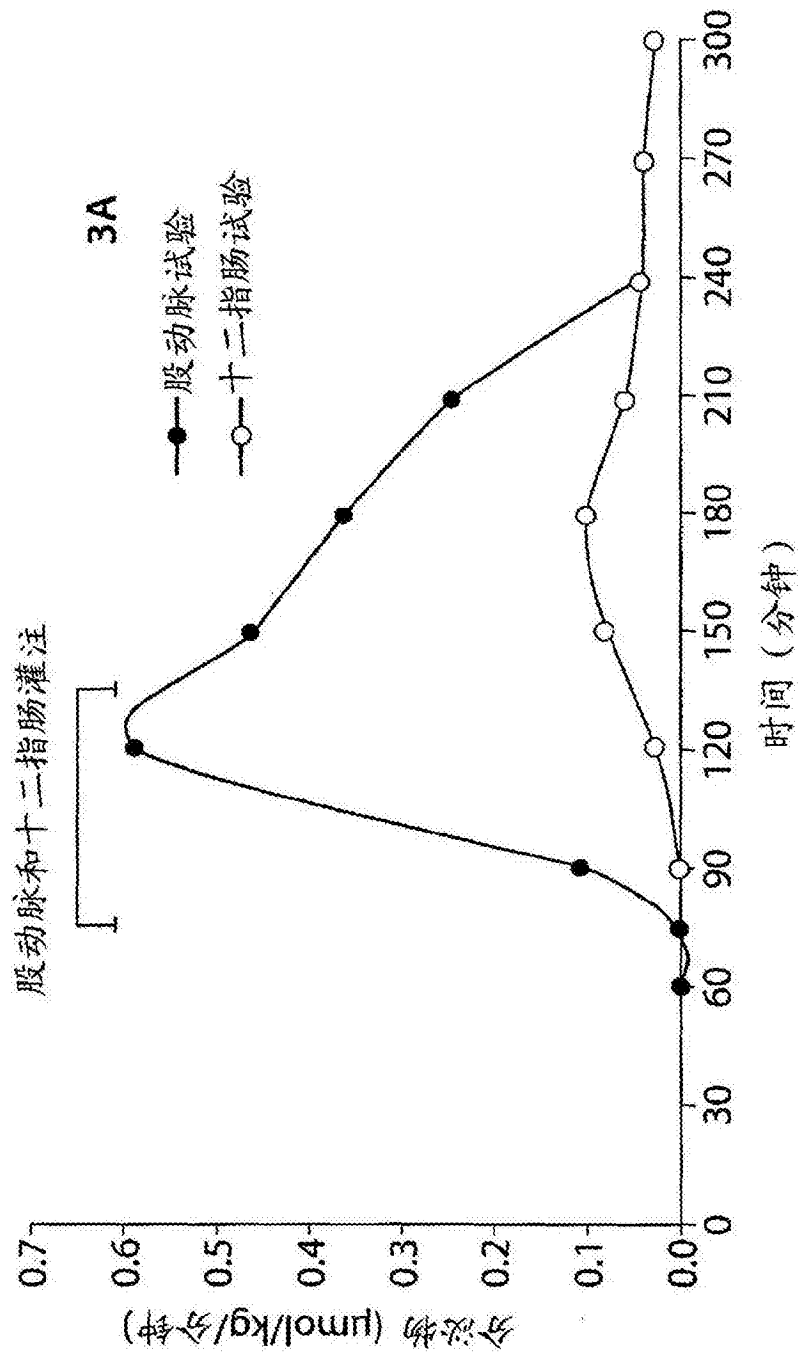


图 5

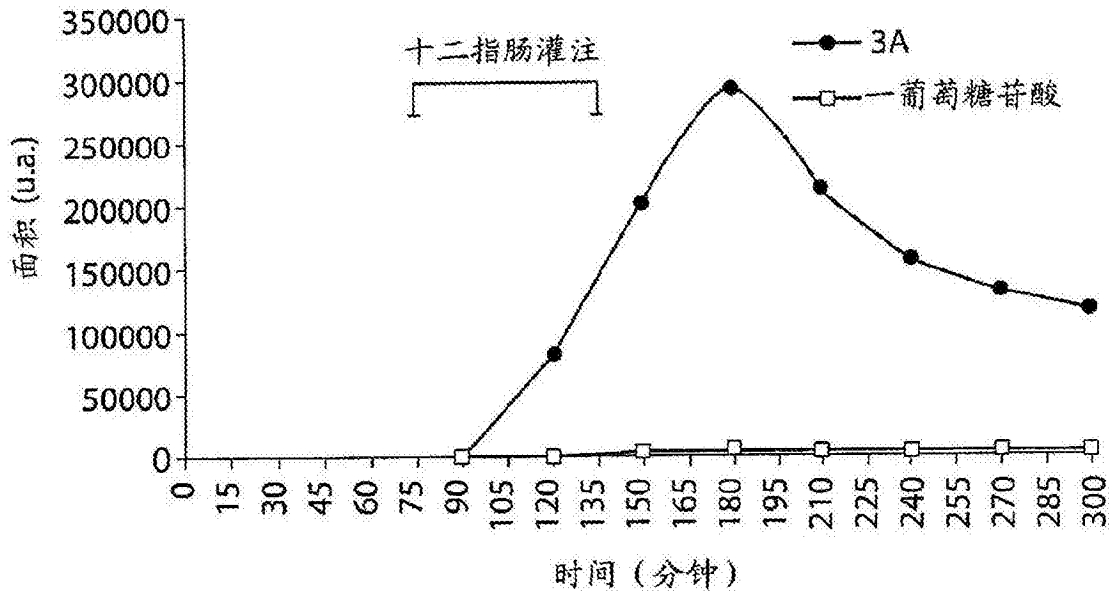


图 6

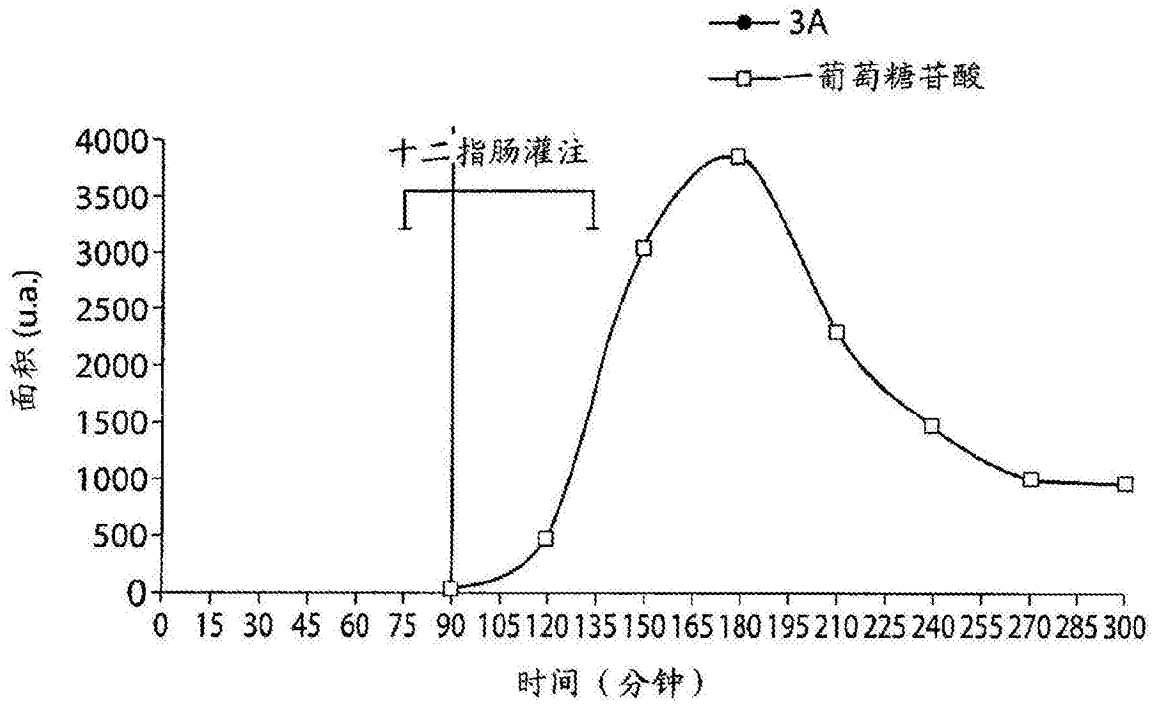


图 7

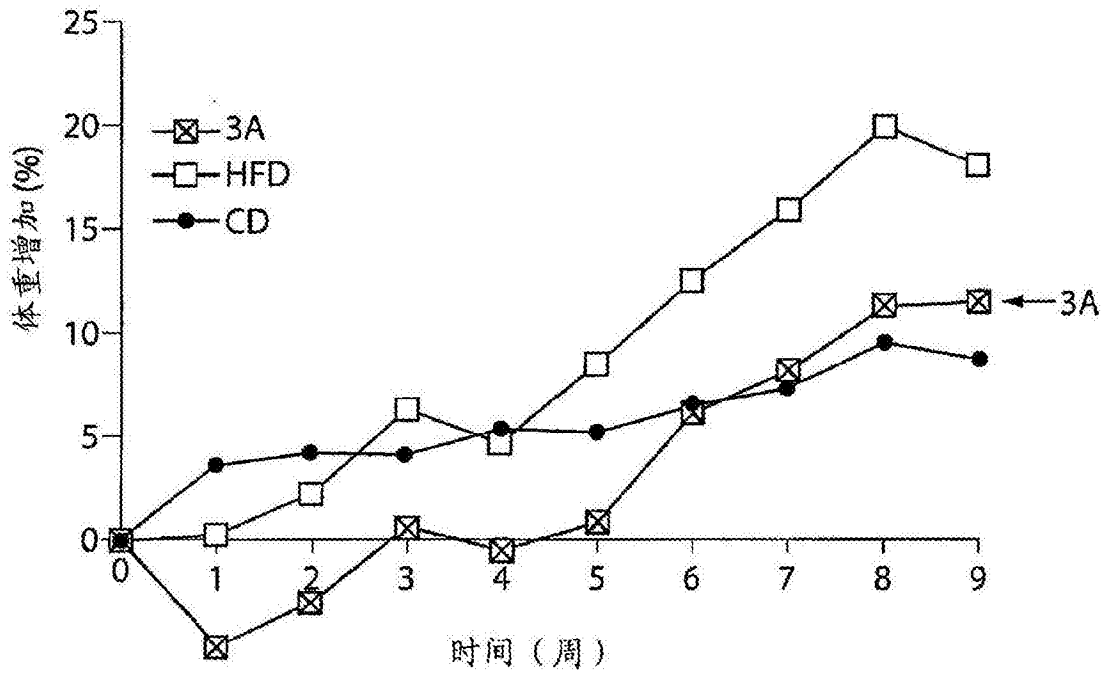


图 8

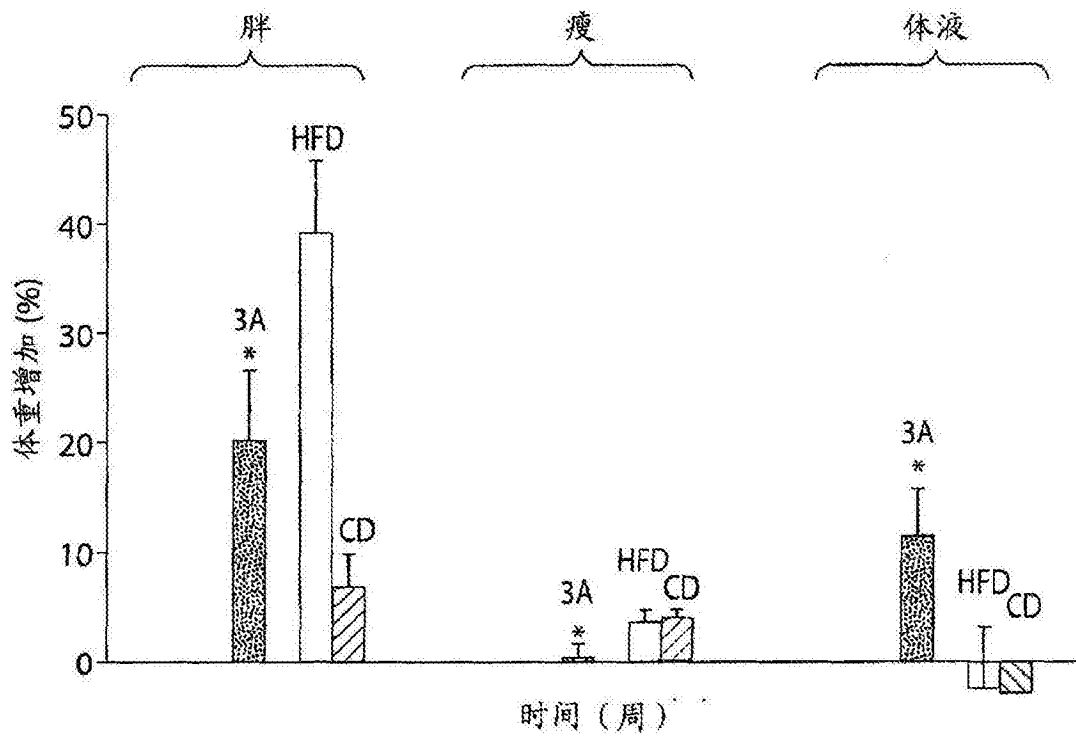


图 9

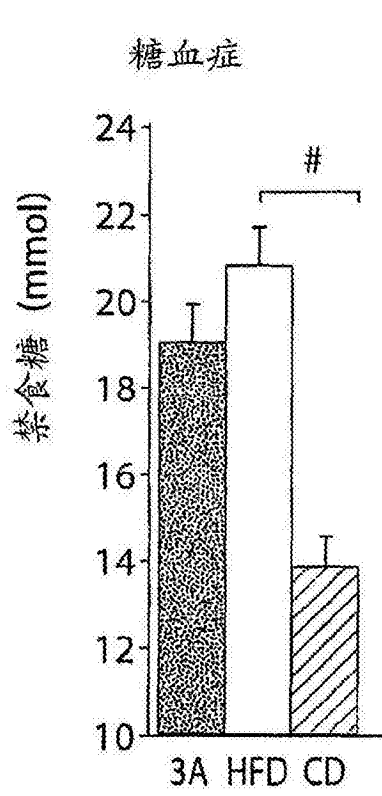


图 10A

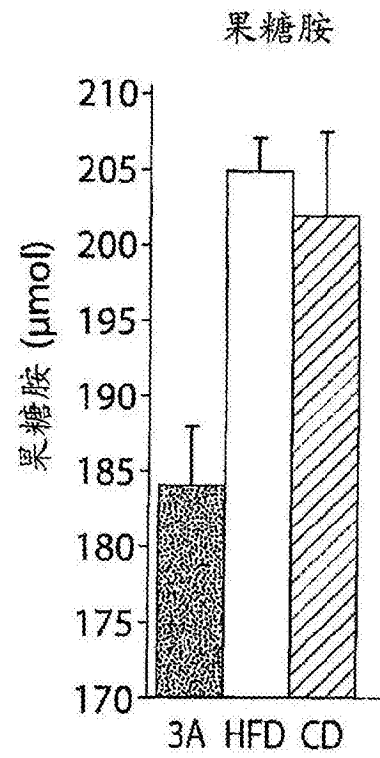


图 10B

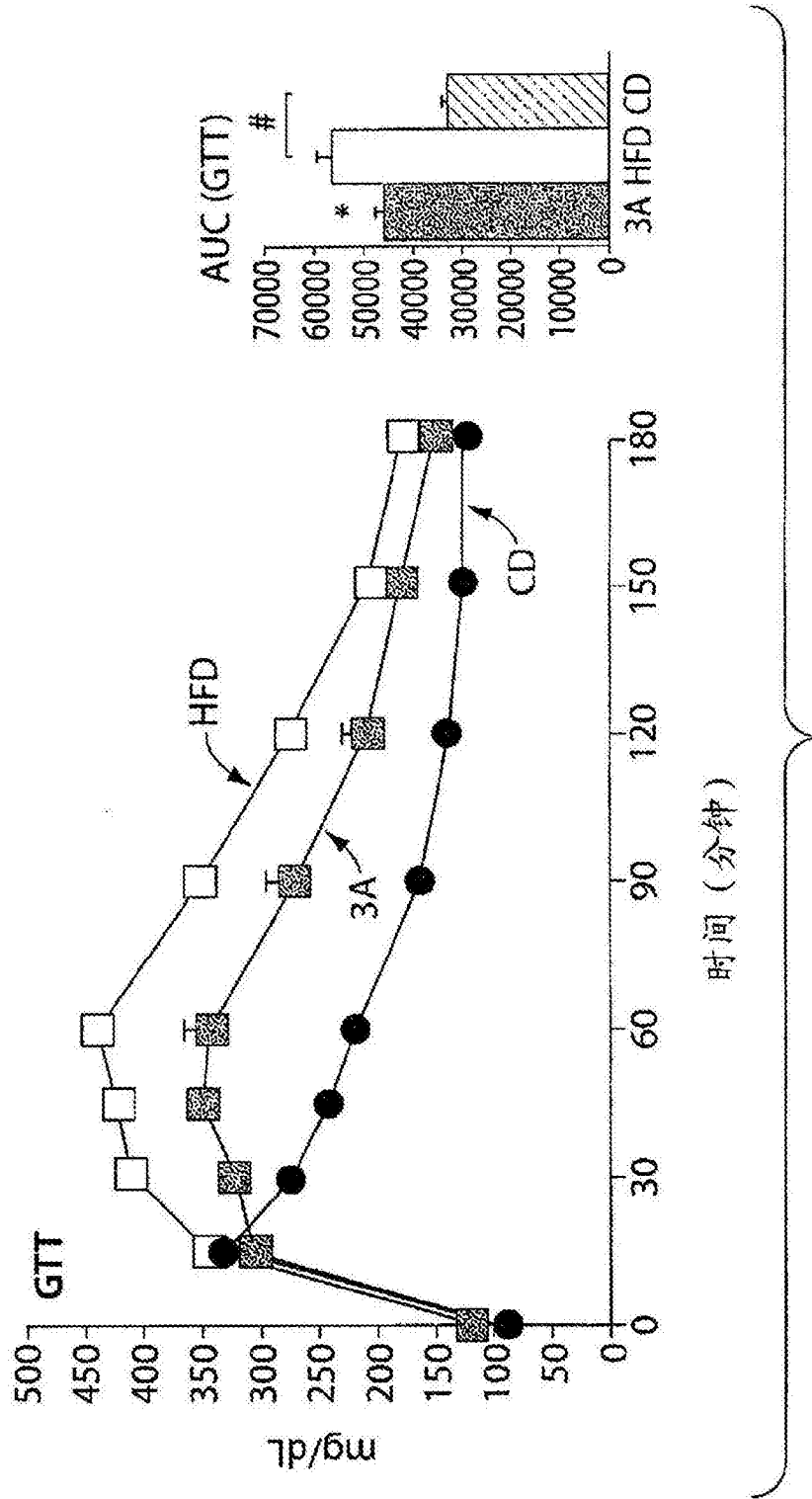


图 10C