



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102282157 B

(45)授权公告日 2017.02.22

(21)申请号 200980154703.7

(22)申请日 2009.11.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102282157 A

(43)申请公布日 2011.12.14

(30)优先权数据

08169460.6 2008.11.19 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2011.07.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/065199 2009.11.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/059859 EN 2010.05.27

(73)专利权人 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 李平 郑霞

(51)Int.Cl.

C07J 9/00(2006.01)

A61K 31/575(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

(56)对比文件

Takashi IIDA et al..《Potential Bile Acid Metabolites. 25. Synthesis and Chemical Properties》.《Clem. Pharm. BULL》.2002,第50卷(第10期),第1327-1334页.

Nonappa et al..《First Chemical Synthesis, Aggregation Behavior and Cholesterol Solubilization Properties of Pythocholic Acid and 16 $\alpha$ -Hydroxycholeic Acid》.《Eur.J. Org.Chem.》.2007,第3331-3336页.

L. R. Hagey et al..《A novel primary bile acid in the Shoebill stork and herons》.《Journal of Lipid Research》.2002,第43卷第685-690页.

审查员 张建宏

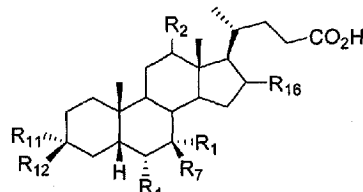
权利要求书1页 说明书41页 附图9页

## (54)发明名称

G蛋白偶联受体5(TGR5)调节剂及其使用方法

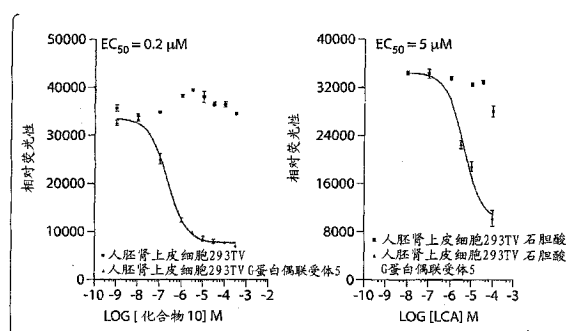
## (57)摘要

本发明涉及结构式(A)所示的化合物:

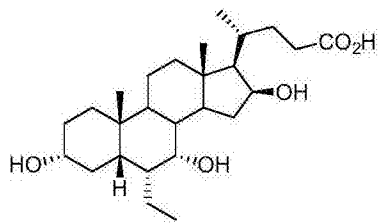


(A)或者是上述

化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物。结构式A所示的化合物是G蛋白偶联受体5(TGR5)调节剂,所述的调节剂能够被有效的用于对疾病的预防以及治疗之中。



1. 一种化合物,其中所述化合物是化合物10:



或者是上述化合物的盐或者甘氨酸共轭物或牛磺酸共

轭物。

2. 一种组合物,所述组合物包括根据权利要求1所述的化合物以及至少一种药理学可接受性赋形剂。

3. 根据权利要求1所述的化合物或根据权利要求2的组合物在制备用于治疗或预防受试者中涉及TGR5受体的调节的疾病的药物中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其中所述疾病选自代谢疾病,炎性疾病,肝脏疾病,自身免疫性疾病,心脏疾病,肾脏疾病,癌症,以及胃肠道疾病。

5. 根据权利要求3或4所述的应用,其中所述药物是通过口服,肠胃外,静脉内,或者局部施用的方式向所述受试者进行施用的。

6. 根据权利要求3或4所述的应用,其中所述受试者是人类。

7. 根据权利要求5所述的应用,其中所述受试者是人类。

## G蛋白偶联受体5(TGR5)调节剂及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求享有申请日为2008年11月19日的欧洲专利申请No.08169460.6的优先权,上述文献中的内容在本发明中被引入。

[0003] 发明的领域

[0004] 本发明涉及到能够调节G蛋白偶联受体5(TGR5)的化合物以及含有这样的化合物的组合物,其中所述的化合物以及组合物能够被有效的用于疾病的治疗以及预防的方法之中。特别的,本发明中所述的化合物是鹅去氧胆酸的类似物,其在所述的C-16位置上存在取代基。

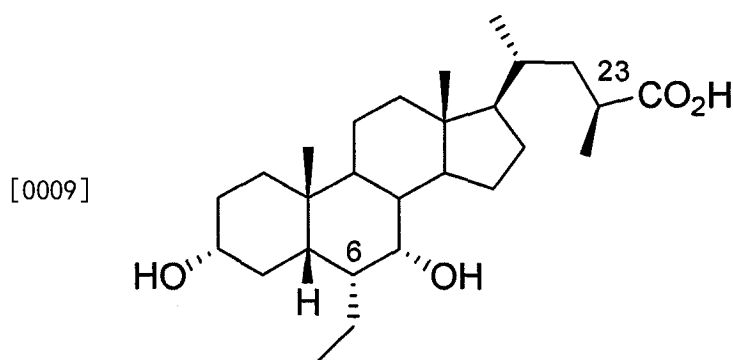
[0005] 发明的背景

[0006] G蛋白偶联受体5(TGR5)受体是一种G蛋白偶联受体,其已经被识别为是一种细胞表面受体,对胆汁酸(BA)进行应答。在人类、牛、兔、大鼠、以及小鼠的G蛋白偶联受体5(TGR5)之间,已经发现了所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)所具有的一级结构以及它对胆汁酸所产生的应答性是高度保守的,并且因此提示了G蛋白偶联受体5(TGR5)具有重要的生理学功能。已经发现G蛋白偶联受体5(TGR5)不仅仅广泛的分布在淋巴组织中,同样也存在于其他组织之中。已经在胎盘、脾脏、以及单核细胞/巨噬细胞中检测到了高水平的G蛋白偶联受体5(TGR5)mRNA。已经显示出,胆汁酸能够诱导所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)功能蛋白从细胞膜向细胞质的内在化作用。参见Kawamata等人于2003年在J.Biol.Chem.《生物化学杂志》278,9435中发表的文章。Takeda等人于2002年在FEBS Lett.520,97-101发表的文章中已经报道了发现G蛋白偶联受体5(TGR5)与人类G蛋白偶联受体19(hGPCR19)是相同的。

[0007] G蛋白偶联受体5(TGR5)与环化腺核苷一磷酸(cAMP)的细胞内积累有关,其中所述的环化腺核苷一磷酸(cAMP)在各种不同的细胞类型中进行广泛的表达。尽管所述的这种膜受体在巨噬细胞中所具有的活化作用能够降低促炎性细胞因子的生成(参见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.,于2003年在J.Biol.Chem.《生物化学杂志》278,9435-9440中发表的文章A G protein-coupled receptor responsive to bile acids《G蛋白偶联受体对胆汁酸所产生的应答》),但胆汁酸在脂肪细胞以及肌细胞中造成的所述的环化腺核苷一磷酸(cAMP)的刺激作用能够增加能量的消耗(参见Watanabe,M.; Houten,S.M.; Matakai,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.,于2006年在Nautre《自然》439,484-489中发表的文章Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation《胆汁酸通过促进细胞内的甲状腺激素的活化作用诱导能量消耗》)。后一种作用涉及到所述的2型碘化钾腺氨酸脱碘酶(D2)的环化腺核苷一磷酸(cAMP)依赖性诱导作用,这种诱导作用通过局部的将T4转化成T3的方式引起增加的甲状腺激素的活性。与G蛋白偶联受体5(TGR5)在所述的能量代谢控制中所起到的作用相一致的是,当利用一种高脂肪的饮食进行挑战时,磁性的G蛋白偶联受体5(TGR5)剔除小鼠表现出显著的脂肪积累并伴随着体重的增加,这意味着所述的G蛋白偶联

受体5(TGR5)的缺失能够减少能量的消耗并且引发肥胖症(参见Maruyama,T.;Tanaka,K.;Suzuki,J.;Miyoshi,H.;Harada,N.;Nakamura,T.;Miyamoto,Y.;Kanatani,A.;Tamai,Y.,于2006年在J.Endocrinol《内分泌学杂志》191,197-205中发表的文章Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1(Gpbar1/MBar)in mice.《小鼠体内的G蛋白偶联胆汁酸受体1(Gpbar1/MBar)的靶向破坏》)。除了G蛋白偶联受体5(TGR5)在能量的动态平衡中所进行的参与之外,并且与G蛋白偶联受体5(TGR5)在能量的动态平衡中所进行的参与相符合的是,同样已经报道了所述的膜受体的胆汁酸活化作用能够促进所述的胰高血糖素样肽1(GLP-1)在鼠科动物肠内分泌细胞系中的生成(参见Katsuma,S.;Hirasawa,A.;Tsujiimoto,G.,于2005年在Biochem.Biophys.Res.Commun.《生物化学与生物物理学研究通讯》329,386-390中发表的文章Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1《胆汁酸经由G蛋白偶联受体5促进胰高血糖素样肽-1在鼠科动物的肠内分泌细胞系中的分泌》)。以上述观察为基础,G蛋白偶联受体5(TGR5)是一种用于进行代谢疾病的治疗的有吸引力的靶向,其中所述的代谢疾病例如是,肥胖症,糖尿病(I型以及II型),血脂异常,非酒精性肝炎(NASH),以及所述的代谢综合症。

[0008] 迄今为止在文献中仅已经对G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂的几个例子进行了描述。近年来,鹅脱氧胆酸的23-烷基取代衍生物以及6,23-烷基取代衍生物已经被报道是一种潜在的以及选择性的G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂,其中所述的衍生物例如是如下文中所述的6 $\alpha$ -乙基-23(S)-甲基-鹅脱氧胆酸(参见Pellicciari,R.;Sato,H.;Gioiello,A.;Costantino,G.;Macchiarulo,A.;Sadeghpour,B.M.;Giorgi,G.;Schoonjans,K.;Auwerx,J.,于2007年在J.Med.Chem.《药物化学杂志》50,4265-4268中发表的文章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《胆汁酸的非基因组行为。23-烷基取代的胆汁酸衍生物以及6,23-烷基取代的胆汁酸衍生物作为g-蛋白偶联受体TGR5的选择性调节剂的合成以及初级特征》)。



[0010] 特别的,在天然胆汁酸的C<sub>23</sub>-(S)位置上发生的甲基化作用能够提供一种显著的选择性,这种选择性是针对G蛋白偶联受体5(TGR5)而不是FXR(法尼酯X受体)的活化作用而言的,尽管所述的6 $\alpha$ -烷基取代作用能够增强两种受体的效能。其他的G蛋白偶联受体5(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-羧酸苯甲酯(参见W0004067008,Takeda化学工业有限公司,日本,2004)以及齐墩果酸(参见Sato,H.;Genet,

C.; Strehle, A.; Thomas, C.; Lobstein, A.; Wagner, A.; Mioskowski, C.; Auwerx, J.; Saladin, R., 于2007年在Biochem. And Biophys. Res. Commun.《生物化学及生物物理学研究通讯》362, 793-798中发表的文章Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from Olea europaea《从橄榄中分离出的G蛋白偶联受体5激动剂所具有的抗高血糖活性》; Ito, F.; Hinuma, K.; Kanzaki, N.; Miki, T.; Kawamata, Y.; Oi, S.; Tawaeaishi, T.; Ishichi, Y.; Hirohashi, M. 于2004年在公开号为PN: W02004067008中发表的文章Preparation of aromatic ring-fused cyclic compounds as TGR5 receptor agonists《作为G蛋白偶联受体5受体拮抗剂的芳香环稠合的环状化合物的制备》)。最近, 对对映体鹅脱氧胆酸(CDCA)以及石胆酸(LCA)所进行的第一次合成已经允许对所述的天然胆汁酸(BA)与G蛋白偶联受体5(TGR5)之间的相互作用所具有的特异性进行评价(参见Katona, B.W.; Cummins, C.L.; Ferguson, A.D.; Li, T.; Schmidt, D.R.; Mangelsdorf, D.J.; Covey, D.F., 于2007年在J. Med. Chem.《药物化学杂志》50, 6048-6058中发表的文章Synthesis, Characterization, and Receptor Interaction Profiles of Enantiomeric Bile Acids《对映体胆汁酸的合成, 鉴定, 以及受体相互作用曲线》)。

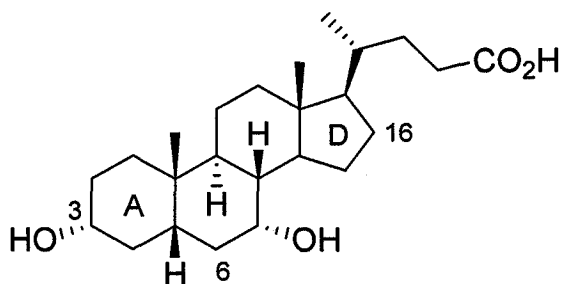
[0011] 尽管这些化学工具已经第一次提供了胆汁酸(BA)的基因组作用以及胆汁酸(BA)的非基因组作用之间所具有的药理学区别, 它们中的一些同样允许提出第一个结构-活性关联性研究, 其中在G蛋白偶联受体5(TGR5)中一种附属的结合袋的存在在确定配体选择性方面起到了关键性的作用(参见Pellicciari, R.; Sato, H.; Gioiello, A.; Costantino, G.; Macchiarulo, A.; Sadeghpour, B.M.; Giorgi, G.; Schoonjans, K.; Auwerx, J., 于2007年在J. Med. Chem.《药物化学杂志》50, 4265-4268中发表的文章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《胆汁酸的非基因组行为. 23-烷基取代的胆汁酸衍生物以及6, 23-烷基取代的胆汁酸衍生物作为g-蛋白偶联受体TGR5的选择性调节剂的合成以及初级特征》)。在这篇文章中, 为了对影响受体的活化作用的另外的特征进行进一步的识别并且对这种受体所具有的生理学作用以及药理学作用进行鉴定, 所述的更为有效的以及选择性的G蛋白偶联受体5(TGR5)调节剂的可利用性是必要的。

[0012] 需要对所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)调节剂进行研发, 用于对疾病的治疗以及预防之中。本发明已经识别出了属于鹅脱氧胆酸类似物的化合物, 其中所述的类似物在C-16位置上具有取代基, 以及使用这样的化合物治疗疾病的方法。

## 发明内容

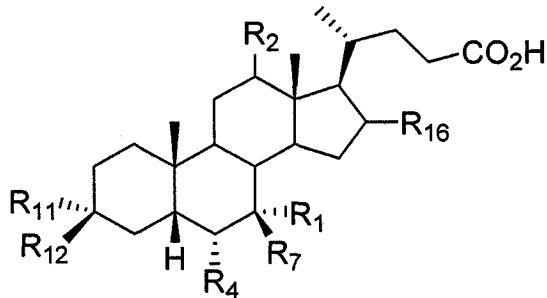
[0013] 本发明涉及化合物以及它们在治疗和预防疾病中的用途, 其中所述的疾病涉及到所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)受体的调节作用, 例如代谢疾病, 炎症疾病, 肝脏疾病, 自身免疫性疾病, 心脏疾病, 肾脏疾病, 癌症, 以及胃肠道疾病。特别的, 本发明中所述的化合物是鹅脱氧胆酸的类似物, 正如在下文中所表示出的, 所述的类似物在所述D环的C-16位置上被发生了取代。

[0014]



[0015] 在一个方面,本发明包括一种具有下述结构式A的化合物:

[0016]



或者是上述化合物的盐,溶剂化物,

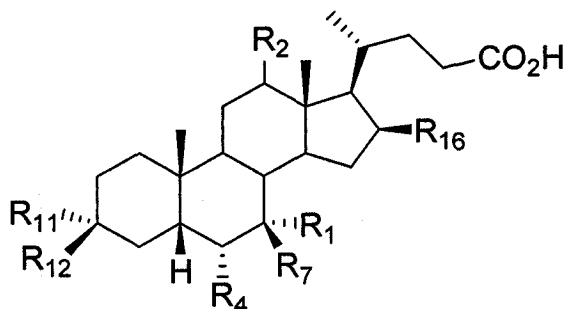
(A)

水合物,或者氨基酸共轭物,其中:R<sub>1</sub>是氢,羟基,被取代的或者未被取代的烷基,或者卤素;R<sub>2</sub>是氢或者羟基;R<sub>4</sub>是氢,被取代的或者未被取代的烷基,或者卤素;R<sub>7</sub>是氢,被取代的或者未被取代的烷基,或者羟基;

[0017] R<sub>11</sub>是羟基,OSO<sub>3</sub>H,OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>,OCOCH<sub>3</sub>,OP<sub>3</sub>H,OP<sub>3</sub><sup>2-</sup>,OC<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>或者氢;[0018] R<sub>12</sub>是羟基,OSO<sub>3</sub>H,OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>,OCOCH<sub>3</sub>,OP<sub>3</sub>H,OP<sub>3</sub><sup>2-</sup>,OC<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>或者是氢,或者由R<sub>11</sub>与R<sub>12</sub>形成了一个羰基;并且[0019] R<sub>16</sub>是羟基,烷氧基,以及卤素,只要当R<sub>2</sub>,R<sub>4</sub>,R<sub>7</sub>以及R<sub>12</sub>是氢时,R<sub>1</sub>以及R<sub>11</sub>是羟基,那么R<sub>16</sub>不是α羟基。

[0020] 在另外一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式B的化合物:

[0021]



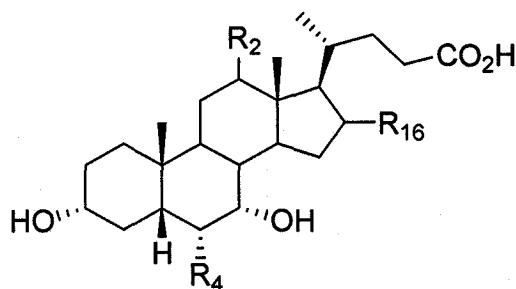
或者是上述化合物的盐,溶剂化

(B)

物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>4</sub>,R<sub>7</sub>,R<sub>11</sub>,R<sub>12</sub>,以及R<sub>16</sub>如上文中所定义。

[0022] 在另外一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式C的化合物:

[0023]

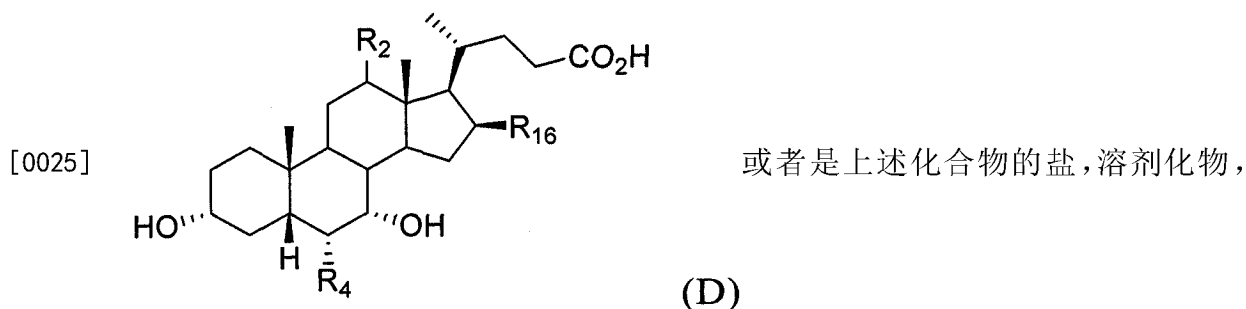


或者是上述化合物的盐,溶剂化物,

(C)

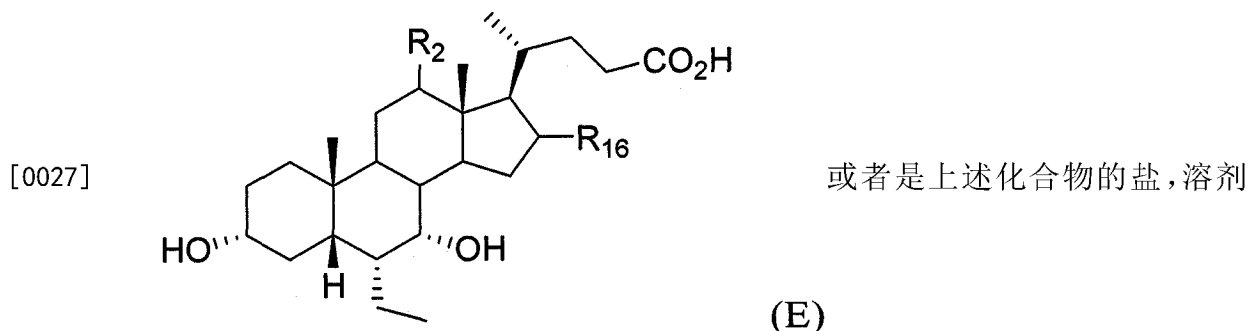
水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_2$ , $R_4$ ,以及 $R_{16}$ 如上文中所定义。

[0024] 在另外一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式D的化合物:



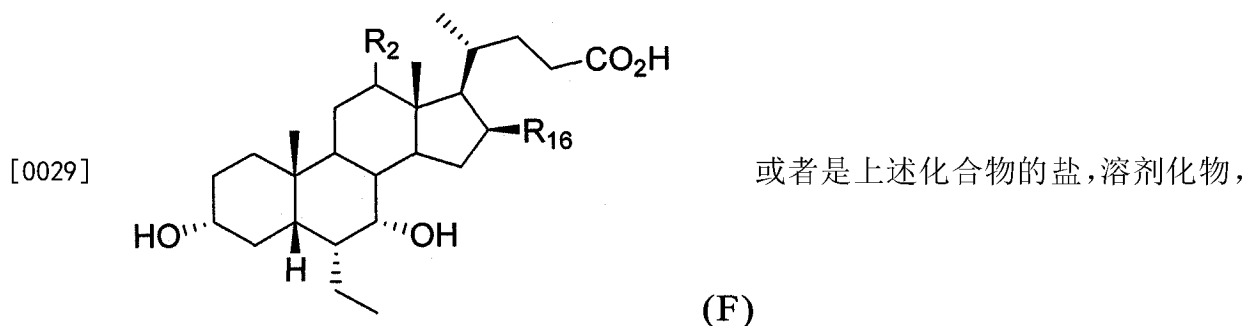
水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_2$ , $R_4$ ,以及 $R_{16}$ 如上文中所定义。

[0026] 在另外一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式E的化合物:



化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_2$ 以及 $R_{16}$ 如上文中所定义。

[0028] 在另外一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式(F)的化合物:

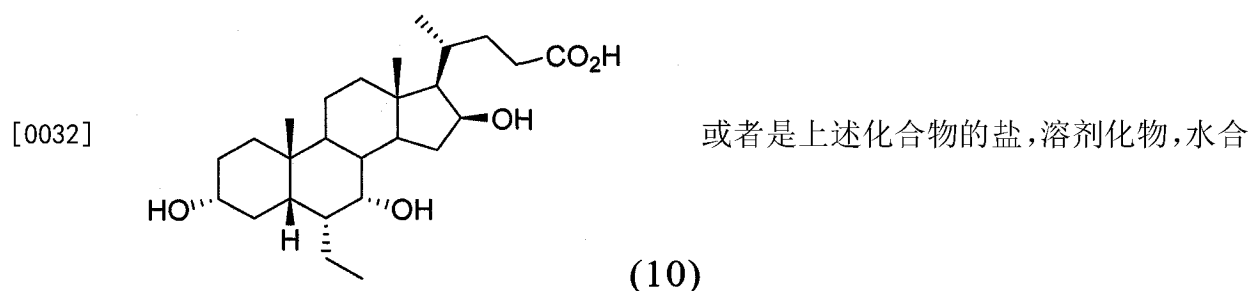


水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_2$ 以及 $R_{16}$ 如权利要求1中所描述。

[0030] 本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_1$ 是羟基。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_7$ 是氢。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中 $R_2$ 是氢。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中 $R_1$ 是 $\alpha$ -羟基。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中 $R_2$ 是 $\beta$ -羟基。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中 $R_4$ 是未被取代的烷基。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中 $R_4$ 是乙基。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_{11}$ 是羟基。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_{12}$ 是氢。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化

物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_{16}$ 是 $\alpha$ 羟基。本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_6$ 是 $\beta$ 羟基。

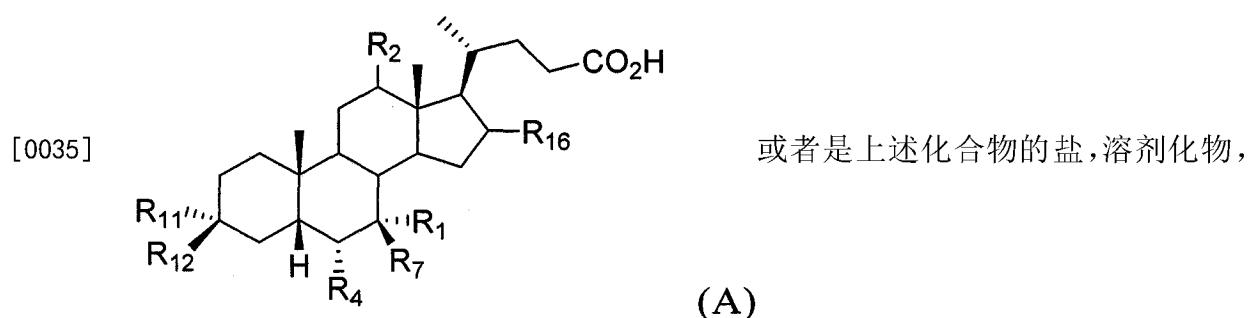
[0031] 本发明包括一种化合物,其中所述的化合物是化合物10:



物,或者氨基酸共轭物。本发明包括一种化合物,其中所述的化合物是一种药理学可接受性盐。

[0033] 本发明包括一种组合物,所述的组合物中包括本发明中所述的化合物以及至少一种药理学可接受性赋形剂。本发明包括一种化合物或者组合物,其中所述的化合物或者组合物可以用于一种治疗或者预防疾病的方法之中,所述的方法包括施用本发明中所述的化合物,本发明包括本发明中所述的一种化合物在制造药物中的用途,其中所述的药物被用在一种治疗或者预防疾病的方法之中。

[0034] 本发明包括一种具有下述的结构式A的化合物的用途,用于制造一种用于治疗或者预防疾病的药物:



水合物,或者氨基酸共轭物,其中: $R_1$ 是氢,羟基,被取代的或者未被取代的烷基,或者卤素;

[0036]  $R_2$ 是氢或者是羟基; $R_4$ 是氢,被取代的或者未被取代的烷基,或者卤素;

[0037]  $R_7$ 是氢,被取代的或者未被取代的烷基,或者羟基; $R_{11}$ 是羟基, $OSO_3H$ , $OSO_3^-$ , $OCOCH_3$ , $OPo_3H$ , $OPo_3^{2-}$ , $OC_6H_8O_6^-$ ,或者是氢; $R_{12}$ 是羟基, $OSO_3H$ , $OSO_3^-$ , $OCOCH_3$ , $OPo_3H$ , $OPo_3^{2-}$ , $OC_6H_8O_6^-$ 或者是氢,或者 $R_{11}$ 与 $R_{12}$ 一同形成了一个羰基;并且 $R_{16}$ 是羟基,烷氧基,以及卤素,只要当 $R_2$ , $R_4$ , $R_7$ ,以及 $R_{12}$ 是氢, $R_1$ 以及 $R_{11}$ 是羟基,那么 $R_{16}$ 不是 $\alpha$ 羟基即可。本发明包括一种治疗疾病的方法,所述的方法是通过向宿主施用一种化合物的方式来实现的,其中所述的化合物具有所述的结构式A,或者是上述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物。

[0038] 本发明包括所述的用途,其中所述的疾病选自代谢疾病,炎症疾病,肝脏疾病,自身免疫性疾病,心脏疾病,肾脏疾病,癌症,以及胃肠道疾病。本发明包括所述的用途,其中所述的化合物或者组合物是通过口服,肠胃外,静脉内,或者局部的方式向所述的宿主施用的。本发明包括所述的用途,其中所述的宿主是人类。

[0039] 上述的描述相当宽泛的列出了本发明所具有的较为重要的特征,其目的在于使得随后的对于本发明的详细描述能够被理解,并且其目的在于对所属领域所作出的目前的贡献能够被更好的认知。本发明所具有的其他的目的以及特征将通过下述的详细描述以及与实施例的结合而变得显而易见。

## 附图说明

[0040] 附图1是由两个曲线图(A-B)所构成的系列图,表示的是使用化合物10(附图1A)以及石胆酸(LCA)(附图1B)在人胚肾上皮细胞293T(HEK293T)上进行的荧光共振能量转移(FRET)检测所得到的结果,其中所述的人胚肾上皮细胞293T(HEK293T)被单独利用载体(V)或者利用表达G蛋白偶联受体5(TGR5)的受体进行了瞬间转染。

[0041] 附图2是由两个曲线图(A-B)所构成的系列图,表示的是化合物10以及石胆酸(LCA)(阳性对照)的反式激活功能检测(CRE-Lucreporter)结果,其中使用的是表达G蛋白偶联受体5(TGR5)的人胚肾上皮细胞293T(HEK293T)细胞。

[0042] 附图3是一个柱状图,表示的是化合物10的G蛋白偶联受体5(TGR5)靶向基因表达检测所具有的结果,其中使用到了肠内人肠道L细胞(NCI-H716)细胞以及石胆酸(LCA)作为阳性对照。

[0043] 附图4是由三个曲线图(A-C)所构成的系列图,表示的是化合物10的体外细胞毒性测试所具有的结果,在所述的测试中对经过4小时的刺激作用之后三磷酸腺苷(ATP)的释放进行了测量,其中使用的是人类的肠内细胞(NCI-H716)。石胆酸(LCA)是一种阳性对照。

[0044] 附图5是由三个曲线图(A-C)所构成的系列图,表示的是化合物10的体外细胞毒性测试所具有的结果,在所述的测试中对经过4小时的刺激作用之后三磷酸腺苷(ATP)的释放进行了测量,其中使用的是肝细胞系(HepG2)。石胆酸(LCA)是一种阳性对照。

[0045] 附图6是一个曲线图,描述的是表面张力,其中所述的表面张力是针对所述的化合物10存在于0.15M的氯化钠中的浓度的运算法则来绘制的。

[0046] 附图7是一项用于十二指肠输液试验的胆汁流动图表,其中所述的试验是使用化合物10来完成的。

[0047] 附图8是一项用于股动脉输液试验的胆汁流动图表,其中所述的试验是使用化合物10来完成的。

[0048] 附图9是一个图表,描述的是在股动脉以及十二指肠输液试验中的分泌速率与时间的关系,其中所述的试验是使用化合物10来完成的。

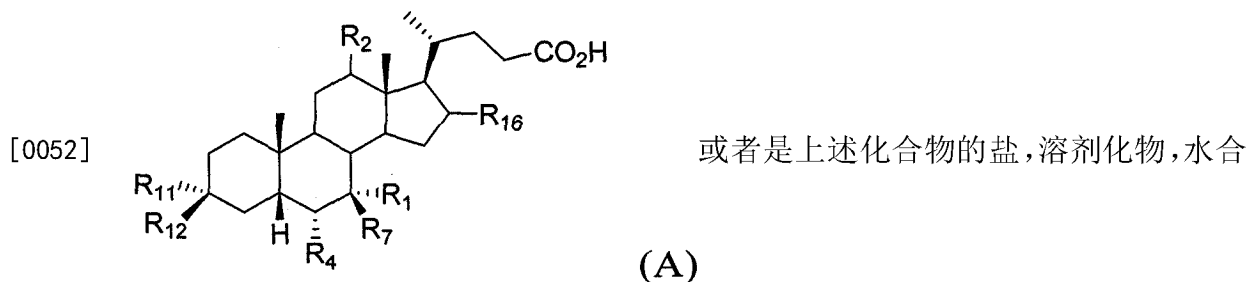
[0049] 附图10是一系列的图表,表示的是在一项静脉内试验中,在胆汁中识别出的化合物10及其主要的代谢产物,其中在所述的试验中使用到了质谱分析。

## 具体实施方案

[0050] 在随后下文中的描述中列出了本发明的一种或者多种实施方式所具有的细节。尽管与本发明中所描述的那些相类似或者相等价的任意的的方法以及物质可以被用来进行本发明的实践或者实验,但现在要对这些方法以及物质进行描述。本发明所具有的其他的特征,目的,以及优点将通过下述的描述而变得显而易见。在所述的说明书中,除非上下文中明确的另外规定,所述的单数形式同样包括所述的复数。除非另外定义,在本发明中所使用

的全部的技术术语以及科学术语将具有与发明所属领域的普通技术人员所普遍理解的含义相同的含义。如果遇到矛盾,本说明书将占主导地位。

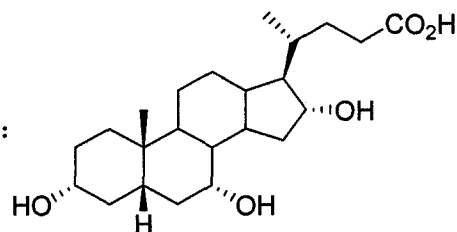
[0051] 在一个方面,本发明包括一种结构式A所示的化合物:



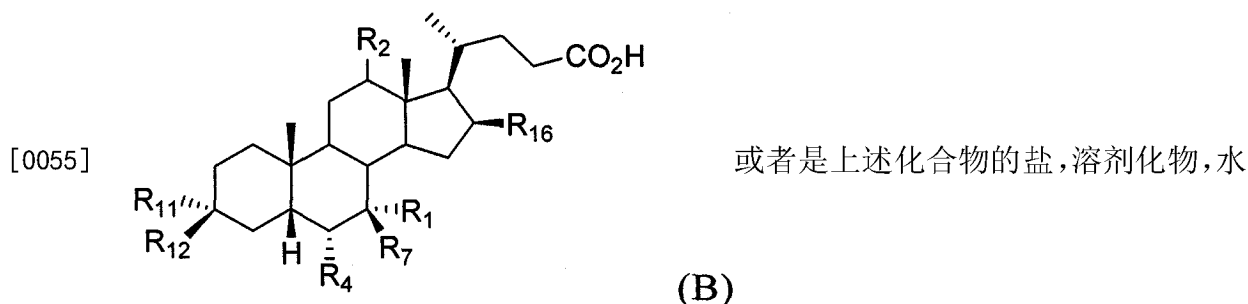
物,或者氨基酸共轭物,其中,R<sub>1</sub>是氢,羟基,被取代的或者未被取代的烷基,或者是卤素;

[0053] R<sub>2</sub>是氢或者是羟基;R<sub>4</sub>是氢,被取代的或者未被取代的烷基,或者是卤素;R<sub>7</sub>是氢,被取代的或者未被取代的烷基,或者是羟基;R<sub>11</sub>是羟基,OSO<sub>3</sub>H,OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>,OCOCH<sub>3</sub>,OPo<sub>3</sub>H,OPo<sub>3</sub><sup>2-</sup>,OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>,或者是氢;R<sub>12</sub>是羟基,OSO<sub>3</sub>H,OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>,OCOCH<sub>3</sub>,OPo<sub>3</sub>H,OPo<sub>3</sub><sup>2-</sup>,OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>,或者是氢,或者R<sub>11</sub>与R<sub>12</sub>共同形成了一个羰基;R<sub>16</sub>是羟基,烷氧基,或者是卤素。在一个方面,本发明不包括这样的化合物,其中R<sub>2</sub>,R<sub>4</sub>,R<sub>7</sub>,以及R<sub>12</sub>是氢,R<sub>1</sub>以及R<sub>11</sub>是羟基,并且R<sub>16</sub>是α羟基。在另外一个方面,本发明提供了一种结构式A所示的化合物或者是上述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,只要当R<sub>2</sub>,R<sub>4</sub>,R<sub>7</sub>,以及R<sub>12</sub>是氢并且R<sub>1</sub>以及R<sub>11</sub>是羟基时,那么R<sub>16</sub>不是α羟

基。在另外一个方面,本发明并不包括下述的化合物:

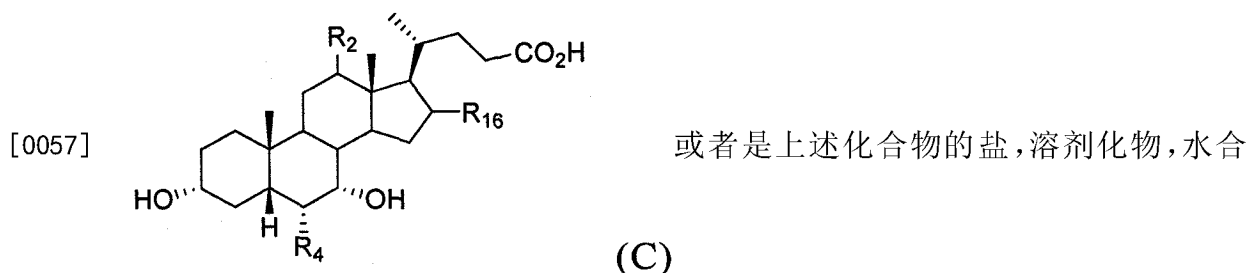


[0054] 在一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式B的化合物:



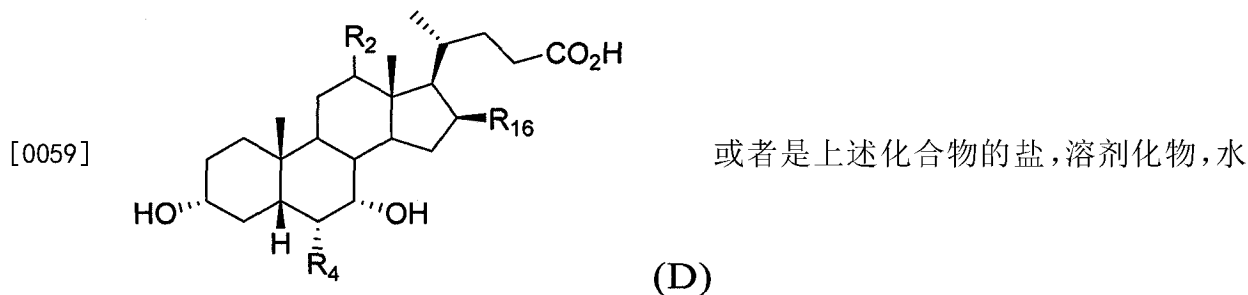
合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>4</sub>,R<sub>7</sub>,R<sub>11</sub>,R<sub>12</sub>,以及R<sub>16</sub>如上文中所定义。

[0056] 在一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式C的化合物:



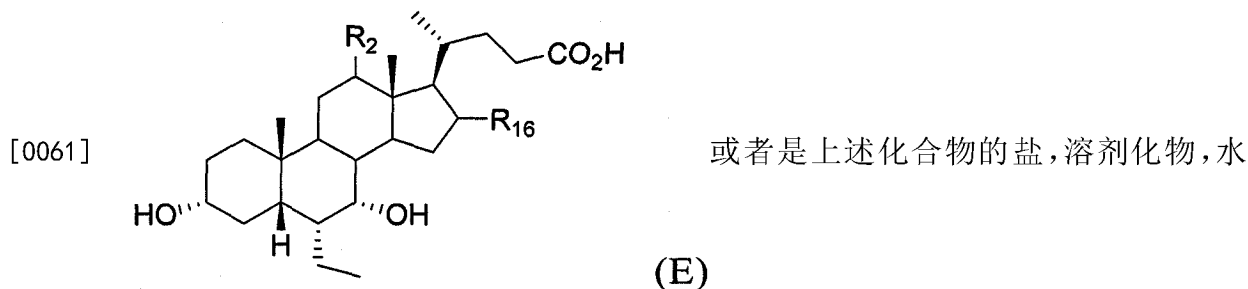
物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>2</sub>,R<sub>4</sub>,以及R<sub>16</sub>如上文中所定义。

[0058] 在一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式D的化合物:



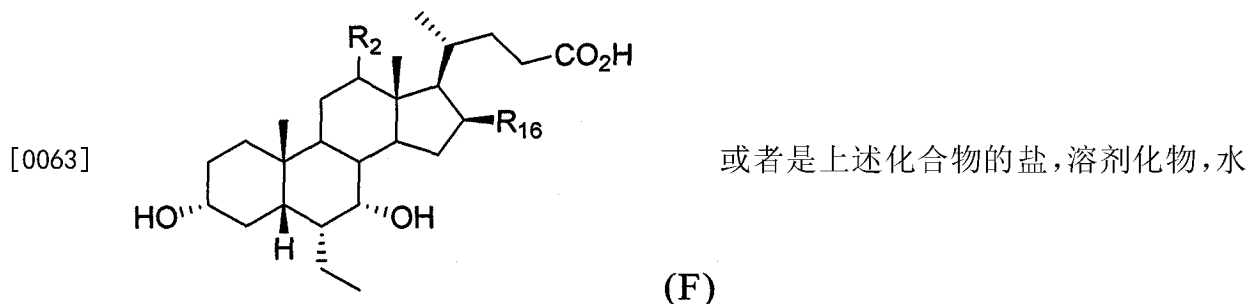
合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>2</sub>,R<sub>4</sub>,以及R<sub>16</sub>如上文中所定义。

[0060] 在一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式E的化合物:



合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>2</sub>以及R<sub>16</sub>如上文中所定义。

[0062] 在一个方面,本发明包括一种具有下述的结构式F的化合物:



合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>2</sub>以及R<sub>16</sub>如上文中所定义。

[0064] 在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>1</sub>是羟基。在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>7</sub>是氢。在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>1</sub>是羟基并且R<sub>7</sub>是氢。

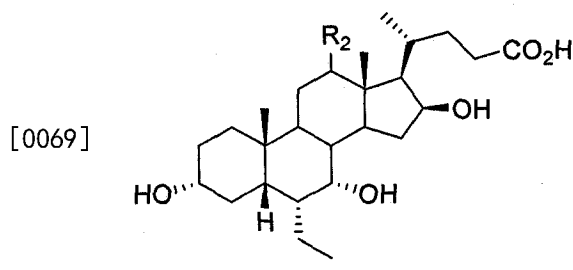
[0065] 在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中R<sub>2</sub>是氢。在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中R<sub>2</sub>是α-羟基。在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中R<sub>2</sub>是β-羟基。

[0066] 在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中R<sub>4</sub>是未被取代的烷基。在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物或者氨基酸共轭物,其中R<sub>4</sub>是乙基。

[0067] 在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中R<sub>11</sub>是羟基。在一个方面,本发明包括一种化合物或者是所述化合物

的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,其中 $R_{12}$ 是氢。

[0068] 本发明包括一种化合物,其中所述的化合物是化合物10:



或者是上述化合物的盐,溶剂化物,水合物,

或者氨基酸共轭物。

[0070] 在一个方面,本发明包括一种化合物,其中所述的化合物是一种药理学可接受性盐。

[0071] 在一个方面,本发明包括一种组合物,所述的组合物中包括本发明中所述的化合物或者是上述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,以及至少一种赋形剂。在一个方面,本发明包括一种组合物,其中所述的组合物中包括一种化合物或者是上述化合物的盐,溶剂化物,水合物,或者氨基酸共轭物,以及至少一种药理学可接受性赋形剂。

[0072] 在一个方面,本发明包括本发明中所述的一种化合物或者组合物用于制造一种药物的用途,其中所述的药物被用来对宿主的疾病进行治疗或者预防。在另外一个方面,本发明包括一种用于对宿主的疾病进行治疗或者预防的方法,所述的方法是通过施用本发明中所述的化合物或者组合物的方式来实现的。在一个方面,本发明包括向所述的宿主施用一种治疗有效剂量的本发明所述的化合物或者组合物。在一个方面,本发明包括施用一种预防有效剂量的本发明所述的化合物或者组合物。

[0073] 在一个方面,本发明包括本发明中所述的化合物或者组合物在制备药物中的用途,其中所述的药物被用来对宿主的疾病进行治疗或者预防,其中在所述的治疗或者预防中涉及到对所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)受体所进行的调节。本发明包括一种用于治疗或者预防宿主的疾病的方法,其中所述的治疗或者预防涉及到对所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)所进行的调节,所述的方法是通过施用本发明中所述的化合物或者组合物的方式来实现的。

[0074] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病选自代谢疾病,炎症疾病,肝脏疾病,自身免疫性疾病,心脏疾病,肾脏疾病,癌症,以及胃肠道疾病。本发明包括一种用于治疗或者预防疾病的方法,其中所述的疾病选自代谢疾病,炎症疾病,肝脏疾病,自身免疫性疾病,心脏疾病,肾脏疾病,癌症,以及胃肠道疾病。

[0075] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病是一种代谢疾病,选自肥胖症,糖尿病,代谢综合征,胰岛素抗性,高血压,以及血脂异常。本发明包括一种用于治疗或者预防一种代谢疾病的方法,其中所述的代谢疾病选自肥胖症,糖尿病,糖尿病性肥胖,代谢综合征,胰岛素抗性,前驱糖尿病性胰岛素抗性,高血压,以及血脂异常。

[0076] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病是一种炎症疾病,选自过敏症,骨关节炎,阑尾炎,支气管哮喘,胰腺炎,过敏性皮炎,以及银屑病。本发明包括一种用于治疗或者预防炎症疾病的方法,其中所述的炎症疾病选自过敏症,骨关节炎,阑尾炎,支气管哮喘,胰腺炎,过敏性皮炎,以及银屑病。

[0077] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病是一种自身免疫性疾病,选自风湿性关节炎,多发性硬化症,以及I型糖尿病。本发明包括一种用于治疗或者预防一种自身免疫性疾病的方法,其中所述的自身免疫性疾病选自风湿性关节炎,多发性硬化症,以及I型糖尿病。

[0078] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病是一种胃肠道疾病,选自炎性肠病(克罗恩病,溃疡性结肠炎),短肠综合症(辐射后大肠炎),微小性结肠炎,过敏性肠综合症(吸收障碍),以及细菌的过度生长。本发明包括一种用于治疗或者预防胃肠道疾病的方法,其中所述的胃肠道疾病选自炎性肠病(克罗恩病,溃疡性结肠炎),短肠综合症(辐射后大肠炎),微小性结肠炎,过敏性肠综合症(吸收障碍),以及细菌的过度生长。

[0079] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病是肾脏疾病,选自糖尿病性肾病,慢性肾衰竭,高血压性肾硬化,慢性血管球性肾炎,慢性移植性肾小球病,慢性间质性肾炎,以及多囊性肾脏疾病。本发明包括一种用于治疗或者预防肾脏疾病的方法,其中所述的肾脏疾病选自糖尿病性肾病,慢性肾衰竭,高血压性肾硬化,慢性血管球性肾炎,慢性移植性肾小球病,慢性间质性肾炎,以及多囊性肾脏疾病。

[0080] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病是癌症,选自结肠直肠癌,肝癌,肝细胞腺癌,胆道腺癌,肾癌,胃癌,胰腺癌,前列腺癌,以及胰岛细胞癌。本发明包括一种用于治疗或者预防癌症的方法,其中所述的癌症选自结肠直肠癌,肝癌,肝细胞腺癌,胆道腺癌,肾癌,胃癌,胰腺癌,前列腺癌,以及胰岛细胞癌。

[0081] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的疾病是一种肝脏疾病,选自非酒精性脂肪肝,非酒精性脂肪肝疾病,慢性病毒性肝炎,酒精性肝病,药物诱发的肝炎,血色沉着病,原发性胆汁硬化,原发性硬化型胆管炎,门静脉高血压,胆汁脱饱和,高歇病,肝豆状核变性, $\alpha$ 1-抗胰胰岛素缺陷,完全肠胃外营养(TPN),胆石病,与完全肠胃外营养(TPN)有关的胆汁郁积症以及脓血症。本发明包括一种用于治疗或者预防肝脏疾病的方法,其中所述的肝脏疾病选自非酒精性脂肪肝,非酒精性脂肪肝疾病,慢性病毒性肝炎,酒精性肝病,药物诱发的肝炎,血色沉着病,原发性胆汁硬化,原发性硬化型胆管炎,门静脉高血压,胆汁脱饱和,高歇病,肝豆状核变性, $\alpha$ 1-抗胰胰岛素缺陷,完全肠胃外营养(TPN),胆石病,与完全肠胃外营养(TPN)有关的胆汁郁积症以及脓血症。

[0082] 在一个方面,本发明包括所述的用途,其中所述的心脏疾病选自充血性心衰竭,心肌梗塞,动脉粥样硬化,心绞痛,动脉硬化症以及脑血管疾病(脑出血,脑卒中,脑血管梗塞)。本发明包括一种用于治疗或者预防心脏疾病的方法,其中所述的心脏疾病选自充血性心衰竭,心肌梗塞,动脉粥样硬化,心绞痛,动脉硬化症以及脑血管疾病(脑出血,脑卒中,脑血管梗塞)。

[0083] 在一个方面,本发明包括一种疾病,所述的疾病涉及到所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)受体的调节作用。在一个方面,本发明包括一种化合物,所述的化合物是一种G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂。在一个方面,所述的化合物是一种超越了类法尼醇X核内受体(FXR)激活剂的选择性的G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂。

[0084] 在一个方面,本发明中所述的化合物或者组合物是通过口服、肠胃外、静脉内、或者局部的方式向所述的宿主进行施用的。在一个方面,所述的宿主是人类。

[0085] 定义

[0086] 出于便利的目的,在此对在所述的说明书、实施例以及后附的权利要求中所使用到的某些术语进行整理。

[0087] 当在本发明中进行使用时,所述的术语“治疗”意味着缓解,减少,减轻,消除,调节,或者改善,即,引起所述的疾病状态或者状况的衰退。

[0088] 当在本发明中进行使用时,所述的术语“预防”意味着完全程度上的或者几乎完全程度上的终止一种疾病状态或者状况在患者或者宿主体内的发生,特别是当所述的患者或者宿主具有这种疾病状态或者状况的倾向时,或者存在染上一种疾病状态或者状况的危险。预防同样可以包括抑制,即,终止一种疾病状态或者状况的发展,并且缓解或者改善,即,引起所述的疾病状态或者状况的衰退,例如当所述的疾病状态或者状况可能已经存在时。

[0089] 当在本发明中进行使用时,所述的术语“氨基酸共轭物”指的是本发明中所述的结构式的化合物与任意适合的氨基酸所形成的共轭物。本发明中所述的结构式的化合物所具有的这样的适合的氨基酸共轭物将具有额外的优点,所述的优点是胆汁或者肠内流体的完整性增强。适合的氨基酸包括但不限于甘氨酸以及牛磺酸。因此,本发明涵盖了本发明中所述的任意一种化合物所具有的甘氨酸共轭物以及牛磺酸共轭物。

[0090] 当在本发明中进行使用时,“BA”意味着胆汁酸以及胆汁酸的衍生物。胆汁酸是来自于胆固醇的类固醇羧酸。主要的胆汁酸是胆汁酸以及鹅脱氧胆酸。在所述的机体中,这些酸在被分泌到所述的胆汁中之前,它们与甘氨酸或者牛磺酸发生了共轭。

[0091] “烷基”包括饱和的脂肪族基团,包括直链的烷基基团(例如,甲基,乙基,丙基,丁基,戊基,己基,庚基,辛基,壬基,癸基),支链的烷基基团(例如,异丙基,叔丁基,异丁基),环烷基(例如,指环族)基团(例如,环丙基,环戊基,环己基,环庚基,环辛基),烷基取代的环烷基基团,以及环烷基取代的烷基基团。在某些实施方式中,一个直链的或者支链的烷基在其骨架内具有六个或者少于六个的碳原子(例如,对于直链而言为C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,对于支链而言为C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)。在一些实施例中,一个直链的或者支链的烷基在其骨架内具有四个或者少于四个的碳原子。进一步的,环烷基在它们的环结构内具有三至八个碳原子。

[0092] 所述的术语“被取代的烷基”指的是这样的烷基半族,所述的烷基半族具有一个取代基,用于对所述的碳氢骨架中所具有的至少一个或者多个碳原子上一个或者多个氢原子进行取代。这样的取代基可以包括,例如,烷基,烯基,炔基,卤素,羟基,烷基羰氧基,芳基羰氧基,烷氧基羰氧基,芳氧基羰氧基,羧酸基,烷基羰基,芳基羰基,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,磷酸基,膦酸基,亚膦酸基,氰基,氨基(包括烷基氨基,二烷基氨基,芳基氨基,二芳基氨基,以及烷基芳基氨基),酰基氨基(包括烷基羰基氨基,芳基羰基氨基,氨基甲酰基以及酰脲基),脒基,亚氨基,巯基,烷基巯基,芳基巯基,硫代羧酸基,硫酸基,烷基硫酸基,磺酸基,氨磺酰基,磺基酰胺基,硝基,三氟甲基,氰基,叠氮,杂环基,烷基芳基,或者是一种芳香族半族或异芳香族半族。

[0093] “芳基”包括具有芳香性的基团,包括具有5个成员以及6个成员的“未共轭的”,或者单环的芳香族基团,其中所述的基团可以包括从零至四个的杂原子,以及“共轭的”,或者多环的体系,其中所述的体系中至少有一个芳香族环。芳基基团的例子包括苯,苯基,吡咯基,呋喃基,噻吩基,噻唑基,异噻唑基,咪唑基,三唑基,四唑基,吡唑基,恶唑基,异恶唑基,吡啶基,吡嗪基,哒嗪基,以及嘧啶基,以及类似物。此外,所述的术语“芳基”包括多环的芳

基基团,例如三环,双环,例如,萘基,苯并恶唑基,苯并二恶唑基,苯并噻唑基,苯并咪唑基,苯并噻吩基,亚甲基二氧基苯基,喹啉基,异喹啉基,萘啶基,吡啶基,苯并呋喃基,嘌呤,苯并呋喃基,氮杂嘌呤,或者吡啶基。那些在所述的环结构中具有杂原子的芳基基团同样可以被称之为“芳基杂环”,“杂环”,“异芳基”或者“异芳香族”。所述的芳香族环可以是被取代的,所述的取代是利用上文中所描述的那样的取代基在至少一个环的位置上所进行的取代,例如,卤素,羟基,烷氧基,烷基羰氧基,芳基羰氧基,烷氧基羰氧基,芳氧基羰氧基,羧酸基,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,磷酸基,膦酸基,亚膦酸基,氰基,氨基(包括烷基氨基,二烷基氨基,芳基氨基,二芳基氨基,以及烷基芳基氨基),酰基氨基(包括烷基羰基氨基,芳基羰基氨基,氨基甲酰基以及酰脲基),脒基,亚氨基,巯基,烷基硫基,芳基硫基,巯基羧酸基,硫酸基,烷基硫酸基,磺酸基,氨磺酰基,磺基酰胺基,硝基,三氟甲基,氰基,叠氮,杂环基,烷基芳基,或者是一种芳香族半族或异芳香族半族。芳基基团同样可以是与指环族环或者杂环进行稠合或者桥接的,其中所述的指环族环或者杂环并不是芳香性的,因此形成了一个多环的体系(例如,萘满,亚甲基二氧基苯基)。

[0094] 除非所述的碳原子的数量被另外指定,正如上文中所定义的,“低级烷基”包括这样的—一个烷基基团,在所述的烷基基团的骨架结构内具有一个至十个碳原子,例如,具有一个至六个碳原子。

[0095] 所述的术语“酯”包括这样的化合物以及半族,在所述的化合物以及半族中含有一个结合有一个氧原子的碳或者杂原子,其中所述的氧原子与一个羰基基团上的碳进行了结合。所述的术语“酯”包括烷氧基羧基基团,例如甲氧基羰基,乙氧基羰基,丙氧基羰基,丁氧基羰基,戊氧基羰基,等等。所述的烷基,烯基,或者炔基基团如上文中所定义。

[0096] 所述的术语“羟基”包括带有一个-OH或者-O<sup>-</sup>的基团。

[0097] 所述的术语“卤素”包括氟,溴,氯,碘,等等。所述的术语“全卤化的”一般而言指的是这样的—一个半族,其中所有的氢都被卤素原子进行了替代。

[0098] 当在本发明中进行使用时,一个“阴离子基团”指的是在生理pH下带有负电荷的基团。阴离子基团包括羧酸基,硫酸基,磺酸基,亚磺酸基,磺胺基,四唑基,磷酸基,膦酸基,亚膦酸基,或者硫代磷酸基或者是上述基团的功能等价物。阴离子基团的“功能等价物”意在包括生物电子等排物,例如,一个羧酸盐基团的生物电子等排物。生物电子等排物涵盖了经典的生物电子等排性的等价物以及非经典的生物电子等排性的等价物。经典的以及非经典的生物电子等排物是本领域已知的(参见,例如,Silverman,R.B.于1992年发表的The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action,Academic Press,Inc.:San Diego,Calif《药物设计与药物作用的有机化学》,学术出版社有限公司,圣地亚哥,加利福尼亚州,第19-23页)。另外一种阴离子基团是一种羧酸盐。

[0099] 所述的术语“不稳定的官能团”指的是一种取代的形式,其中所述的取代形式中含有一个不稳定的连接,例如,一个在生理条件下(例如,存在于中性的pH范围之内的水性溶液)容易发生水解或者断裂的官能团或者键。不稳定的官能团的例子包括乙缩醛以及酮缩醇。

[0100] 除此之外,本发明中所述的化合物,例如,所述化合物的盐,可以以水合的形式或者未被水合(无水)的形式存在或者以溶剂化物的形式存在,其中所述的溶剂化物是利用其

他的溶剂分子而形成的。水合物的非限制性的例子包括一水合物,二水合物,等等。溶剂化物的非限制性的例子包括乙醇的溶剂化物,丙酮的溶剂化物,等等。

[0101] “溶剂化物”意味着溶剂加成的形式,其中含有化学计算的或者非化学计算的剂量的溶剂。一些化合物具有在所述的结晶固体状态下捕获一种固定的摩尔比例的溶剂分子的趋势,因此形成一种溶剂化物。如果所述的溶剂是水,则所形成的溶剂化物是一种水合物,当所述的溶剂是酒精时,则所形成的溶剂化物是一种醇化物。水合物是通过所述的一个或者多个水分子与一种物质之间的结合的方式来形成的,其中在所述的物质中所述的水保持其分子状态 $H_2O$ ,这样的结合能够形成一个或者多个水合物。

[0102] 将会被提到的是,本发明中所述的一些化合物所具有的结构将包括不对称的碳原子。因此应当被理解的是,除非另外指出,来自于这样的不对称现象的所述异构体(例如,所有的对映异构体以及非对映异构体)被包含在本发明所具有的范围之内。可以通过经典的分离技术以及通过立体化学控制性合成以本质上纯化的形式获得这样的异构体。依据由R.S.Cahn,C.Ingold,以及V.Prelog制订的所述系统为对映异构体(R-构型以及S-构型)进行命名。

[0103] 进一步的,在这篇申请中讨论的所述的结构以及其他的化合物包括它们所有的阿托异构体。阿托异构体是一种类型的立体异构体,在所述的立体异构体中所述的两个异构体所具有的原子在空间上的排列是不同的。阿托异构体把它们的存在归因于一种受限制的旋转作用,这种旋转作用是通过大基团围绕一个中心键的旋转作用所受到的障碍而引发的。这样的阿托异构体一般情况下是以一种混合物的形式存在的,然而作为色谱技术的近来发展的结果,在选定的情形下对两种阿托异构体的混合物进行分离已经成为可能。

[0104] “稳定的化合物”以及“稳定的结构”意在表示这样一种化合物,所述的化合物足够稳固以至于能够承受住从一种反应混合液中的分离,使之达到一种有效程度的纯度,并且被配制成为一种有效的治疗试剂。

[0105] 当在本发明中进行使用时,所述的术语“类似物”指的是这样的一种化学化合物,所述的化合物在结构上与另外一种相类似但是在组成方面具有些许的差别(差别在于利用一种不同元素的原子对一个原子所进行的取代或者一种特定的官能团的存在,或者利用另外一种官能团对一个官能团所进行的取代)。因此,类似物是这样的一种化合物,所述的化合物与所述的参考化合物相比在功能和外观上是相类似的或者是相当的。

[0106] 正如在本发明中所定义的,所述的术语“衍生物”,例如在所述的术语“胆汁衍生物”中,指的是这样的化合物,所述的化合物具有一个共同的有4个成员的环结构的核心部分,并且其被如本发明中所描述的各种不同的基团进行了取代。

[0107] 所述的术语“生物电子等排物”指的是这样的一种化合物,所述的化合物是由于一个原子或者一个原子团与另外一个广泛意义上相类似的原子或者原子团发生交换而产生的。所述的生物电子等排性的替代可以是基于物理化学的或者是基于拓扑学的。羧酸生物电子等排物的例子包括酰基磺酰亚胺基,四唑基,磺酸基,以及磷酸基。参见,例如,Patani以及LaVoie(于1996年)在Chem.Rev.《化学评论》96,3147-3176中发表的文章。

[0108] “组合治疗”(或者“协同治疗”)包括本发明中所述的一种化合物与作为一个具体的治疗方案中的一部分的至少一种另外的试剂的施用,其中所述的治疗方案意在提供来自于这些治疗性试剂(即,本发明中所述的化合物以及至少一种另外的试剂)所产生的协同作

用的有益效果。所述的结合所具有的有益效果包括,但不局限于,所述的治疗性试剂的组合所产生的药物动力学协同作用或者药效动力学协同作用。这些治疗性试剂的组合施用一般情况下是在一个被定义的时间阶段内(通常是分钟,小时,天或者周,这取决于所选择的所述组合)来进行的。“组合治疗”可以,但一般而言并不是,意在涵盖作为单独的单一治疗方案的一部分而进行的两种或者多种这样的治疗性试剂的施用,这些单一治疗方案顺带的并且随意的形成了本发明中所述的组合。“组合治疗”意在包含以一种有次序的方式对这样的治疗性试剂所进行的施用,即,其中每一种治疗性试剂是在一个不同的时间处被进行施用的,也包含以一种本质上同时的方式对这样的治疗性试剂所进行的施用,或者以一种本质上同时的方式对至少两种所述的治疗性试剂所进行的施用。本质上同时进行的施用可以通过下述方式来实现,例如,通过向所述的宿主施用单一胶囊的形式来实现,其中所述的单一胶囊中含有一种固定比例的每一种治疗性试剂,或者以多个单一胶囊的形式来实现,其中每一个胶囊对应一种所述的治疗性试剂。可以通过任何适宜的途径来实现每一种治疗性试剂的依次施用或者本质上的同时施用,其中所述的途径包括,但不局限于,口服途径,静脉内途径,肌肉内途径,以及经由黏膜组织的直接吸收。所述的治疗性试剂可以通过所述的相同途径或者通过不同的途径来进行施用。例如,可以通过静脉内注射的方式对所选择的所述组合之中的第一种治疗性试剂进行施用,而可以通过口服的方式对所述组合之中的其他治疗性试剂进行施用。可供选择的,例如,可以以口服的方式对所有的治疗性试剂进行施用或者可以通过静脉内注射的方式对所有的治疗性试剂进行施用。所述的治疗性试剂的施用顺序并不是被严格界定的。

[0109] “组合治疗”同样包含如上文中所描述的所述治疗性试剂的施用与其他的生物学活性成分以及非药物的治疗方法(例如,外科手术或者机械处理)所进行的进一步的组合。在所述的组合治疗进一步的包括一种非药物治疗的情形中,所述的非药物治疗可以在任意适合的时间处实施,只要能够实现来自于所述的治疗性试剂以及非药物治疗的组合物的协同作用的有益效果即可。例如,在适宜的情形下,当从所述的治疗性试剂的施用过程中暂时除去所述的非药物治疗时,或许是几天或者甚至是几周,仍然能够实现所述的有益效果。

[0110] 当在本发明中进行使用时,所述的术语“肠胃外施用”以及“通过肠胃外的方式进行施用”指的是不同于肠内施用以及局部施用的施用模式,通常情况下是通过注射的方式,并且包括,但不局限于,静脉内,肌肉内,动脉内,脑脊髓膜内,关节囊内,眼窝内,心脏内,皮层内,腹膜内,经气管,皮下,角质层下,关节内,囊下,蛛网膜下,脊柱内以及胸骨内的注射以及输液。

[0111] “治疗有效剂量”的本发明所述的化合物或者化合物的组合指的是化合物所具有的一种剂量(质量或者浓度)。在一种实施方式中,当向需要接受治疗的宿主施用一种治疗有效剂量的化合物时,由所述的疾病所引发的症状会立即得到改善,或者经过一次或者多次的所述化合物的施用之后,由所述的疾病所引发的症状会得到改善。需要向宿主进行施用的所述的化合物所具有的剂量将取决于所述的具体障碍,所述的施用模式,共同施用的化合物,如果存在的话,以及所述宿主所具有的特征,例如一般健康,其他疾病,年龄,性别,基因型,体重以及对药物的耐受性。本领域熟练技术人员将能够根据这些因素以及其他因素对适宜的剂量进行确定。

[0112] 所述的术语“预防有效剂量”意味着被施用的本发明中所述的化合物或者化合物

的组合所具有的一种剂量(质量或者浓度),其中所述的剂量能够预防疾病或者降低患有疾病的危险——换句话说,是提供一种防止性作用或者预防性作用所需要的剂量。需要向宿主进行施用的所述的化合物所具有的剂量将取决于所述的具体障碍,所述的施用模式,共同施用的化合物,如果存在的话,以及所述宿主所具有的特征,例如一般健康,其他疾病,年龄,性别,基因型,体重以及对药物的耐受性。

[0113] 当在本发明中进行使用时,所述的术语“降低……的危险”意味着减少在一个患者中发生下述疾病的可能性或者概率,所述的疾病是:中枢神经系统疾病,炎性疾病和/或代谢疾病,特别是当所述的患者或者宿主具有这样的发病率的倾向时。

[0114] 本发明中所述的一种化合物的“盐”是所述化合物的一种产物,所述的产物中含有一种离子键并且其在一般情况下是通过所述化合物与一种酸或者一种碱发生反应的方式来制备得到的。

[0115] “药物学可接受性盐”指的是一种适合向宿主施用的盐。

[0116] “组合物”是一种制剂,所述的制剂中含有本发明中所述的一种化合物,其中所述的化合物是以一种适合对宿主进行施用的形式存在的。在另外一种实施方式中,所述的药物组合物是以散装的形式存在或者是以单位计量的形式存在的。所述的单位计量的形式指的是各种不同形式中的任意一种,包括,例如,胶囊,静脉内(IV)输液袋,片剂,存在于气雾剂吸入器上的单流向泵,或者是小瓶。存在于一种单位计量的组合物之中的所述的活性成分(例如,本发明所述化合物或者是上述化合物的盐的一种制剂)所具有的质量是一种有效的剂量,所述的有效剂量是依照所涉及的具体的治疗而存在变化的。本领域技术人员将能够认识到,有时对所述的剂量进行常规的改变是必要的,这种改变取决于所述患者所具有的年龄以及状况。各种不同的途径是可以预期的,包括口服,肺部,直肠,肠胃外,透皮,皮下,静脉内,肌肉内,腹膜内,鼻内,以及类似的途径。用于进行局部施用或者透皮施用的本发明中所述化合物的剂量形式包括粉末,喷雾,药膏,贴剂,乳霜,乳液,凝胶,溶液,片剂以及吸入剂。在另外一种实施方式中,在无菌条件下将所述的活性化合物与一种药物学可接受性载体进行混合,并且与所需要的任意的防腐剂,缓冲剂,或者推进剂进行混合。

[0117] 所述的术语“瞬间剂量(flash dose)”指的是能够发生快速分散的剂量形式的化合物制剂。

[0118] 所述的术语“立即释放”被定义为在一个相对简短的时间段内,化合物从一种剂量形式中的释放,其中所述的相对简短的时间段一般情况下能够达到大约60分钟。所述的术语“经过修饰的释放”被定义为包括延时释放,延长释放,以及脉冲释放。所述的术语“脉冲释放”被定义为药物从一种剂量形式中进行的一连串的释放。所述的术语“持续释放”或者“延长释放”被定义为一种化合物在一段延长的时间段内从一种剂量形式中进行的连续的释放。

[0119] “宿主”包括哺乳动物,例如,人类,伴侣动物(例如,狗,猫,鸟,以及类似的动物),农场动物(例如,牛,羊,猪,马,家禽,以及类似的动物)以及实验室动物(例如,大鼠,小鼠,豚鼠,鸟,以及类似的动物)。一般情况下,所述的宿主是人类。

[0120] 本发明中所述的化合物同样包括前体药物或者生理学等价的衍生物。“前体药物”或者“生理学等价的衍生物”包括所述药物的一种前体形式,其中所述的前体形式能够通过代谢方式在体内进行转化从而生成所述的活性药物。本发明进一步的预期到了所述的前体

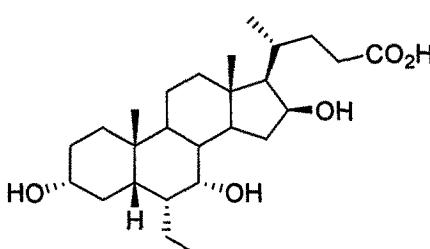
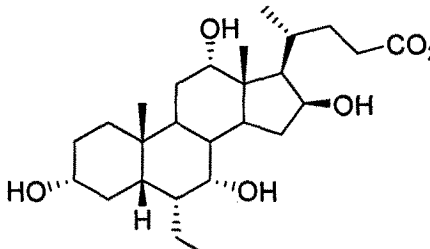
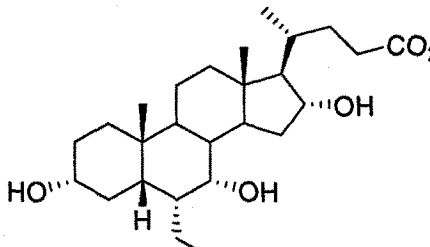
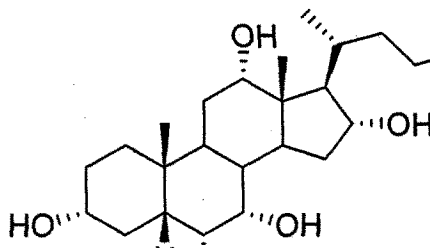
药物在本发明所述的方法之中的用途,其中所述的前体药物能够在体内转化成为所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)调节化合物(参见,例如R.B.Silverman,于1992年发表的“The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action”《药物设计与药物作用的有机化学》,Academic Press学术出版社,第八章)。这样的前体药物可以用来对所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)调节化合物所具有的生物学分布(例如,用以允许那种本来在一般情况下不能够穿过所述的血脑障碍的化合物穿过所述的血脑障碍)或者药物动力学进行改变。例如,一种阴离子基团可以被进行酯化,从而生成一种酯,其中所述的阴离子基团例如是一个羧酸盐,硫酸盐或者磺酸盐,其可以利用一种烷基基团(例如,一个甲基基团)或者一种苯基基团被进行酯化。当所述的酯被施用给宿主时,所述的酯通过酶解的方式或者非酶解的方式,还原性的或者水解性的被切断,从而展现出所述的阴离子基团。这样的一种酯可以是环状的,例如,是一个环状的硫酸基或者磺酸基,或者是可以经由一个连接基团发生酯化的两个或者多个阴离子半族。可以利用半族对一种阴离子基团进行酯化(例如,乙酰氧基甲酯),其中所述的半族被切断从而展现出一种中间产物形式的G蛋白偶联受体5(TGR5)调节化合物,所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)调节化合物随后发生分解从而生成所述的活性G蛋白偶联受体5(TGR5)调节化合物。在一种实施方式中,所述的前体药物是一种还原形式的羧酸酯,硫酸酯或者磺酸酯,例如,一种醇或者硫醇,其可以在体内被氧化成为所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)调节化合物。此外,一种阴离子半族可以被酯化成为一种这样的基团,所述的基团能够在体内进行活跃的运输,或者所述的基团能够被靶向器官进行选择性的吸收。

[0121] 所述的术语“G蛋白偶联受体5(TGR5)调节剂”意味着任何这样的化合物,所述的化合物能够与所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)受体发生相互作用。所述的相互作用并不局限于一种这样的化合物,所述的化合物作为所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)受体的一种拮抗剂、激动剂、部分激动剂,或者反相激动剂来发挥作用。在一个方面,本发明中所述的化合物作为一种G蛋白偶联受体5(TGR5)受体的拮抗剂来发挥作用。在另外一个方面,本发明中所述的化合物作为一种G蛋白偶联受体5(TGR5)受体的激动剂来发挥作用。在另外一个方面,本发明中所述的化合物作为一种G蛋白偶联受体5(TGR5)受体的部分激动剂来发挥作用。在另外一个方面,本发明中所述的化合物作为一种G蛋白偶联受体5(TGR5)受体的反相激动剂来发挥作用。传统意义上一种内生性的或者合成性的配体所具有的曲线的特征在于它所具有的内在功效“e”,这最初是由Furchgott在1966年进行描述的。它被用来表达当占据了相同数量的所述受体时,所述的不同配体生成各种不同的生物学应答的程度。一般情况下,所述的术语“激动剂”意味着这样的一种化合物,所述的化合物能够对另外一个分子或者受体位点所具有的活性进行增强。根据经典的定义,一种激动剂,无论是一种正位作用激动剂,别构作用激动剂,反相激动剂或者是协同激动剂,都具有下述的性质:与所述的受体进行结合,改变其受体状态并且引发一种生物学作用。因此,激动作用被定义为一种激动剂或者一种配体所具有的生成一种生物学作用的性质。与此相反的是,“拮抗剂”从本质上而言是一种激动剂,它对相同的受体大分子具有高度的亲和性,但是具有非常微弱或者可以忽略不计的内在功效,并且因此在原子的空间排列方面对一种激动剂所产生的生物学作用进行阻止。作为一种性质,拮抗作用可以是功能性的或者是生理性的,其中激动剂对在前的所述受体位点而言具有直接的竞争作用,而经由一种不同的受体-信使系统在后产生相反的作用。更为具体的,一种G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂是一种受体配体或者化合物,所述的受体

配体或者化合物能够与G蛋白偶联受体5(TGR5)进行结合并且在表达所述受体的细胞中以至少20%的程度对所述的环化腺核苷一磷酸(cAMP)所具有浓度进行增加。相反的,一种G蛋白偶联受体5(TGR5)拮抗剂将是这样的一种化合物,所述的化合物能够对一种激动剂所具有的活性进行拮抗或者阻滞,从而实现所述的环化腺核苷一磷酸(cAMP)的浓度的降低。

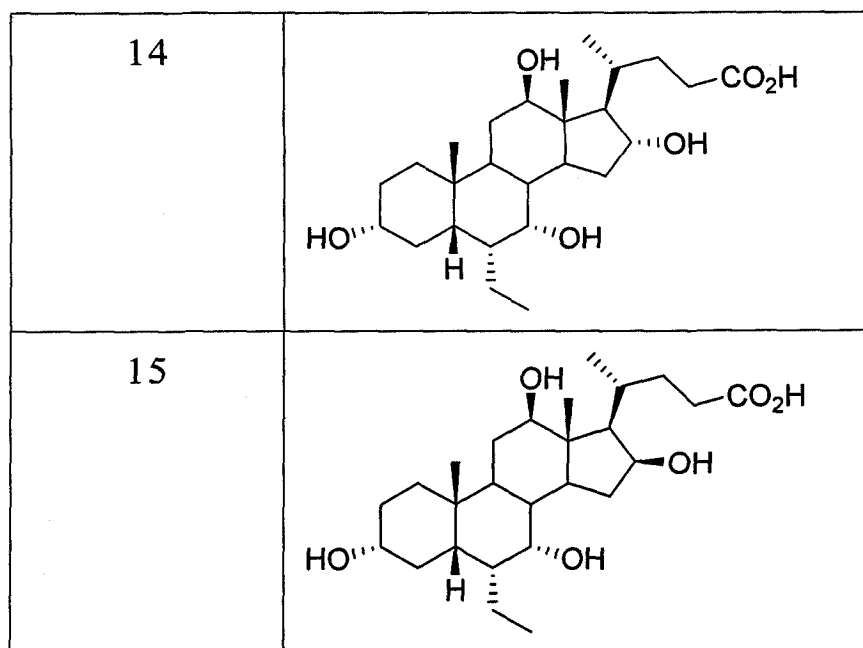
[0122] 本发明涉及到具有G蛋白偶联受体5(TGR5)受体调节活性的化合物以及它们在治疗和预防代谢疾病方面的用途,其中所述的代谢疾病例如是肥胖症以及胰岛素敏感。

[0123] 本发明中所述的化合物如下所示。

| 化合物编号 | 结构                                                                                   |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 10    |    |
| 11    |   |
| 12    |  |
| 13    |  |

[0124]

[0125]



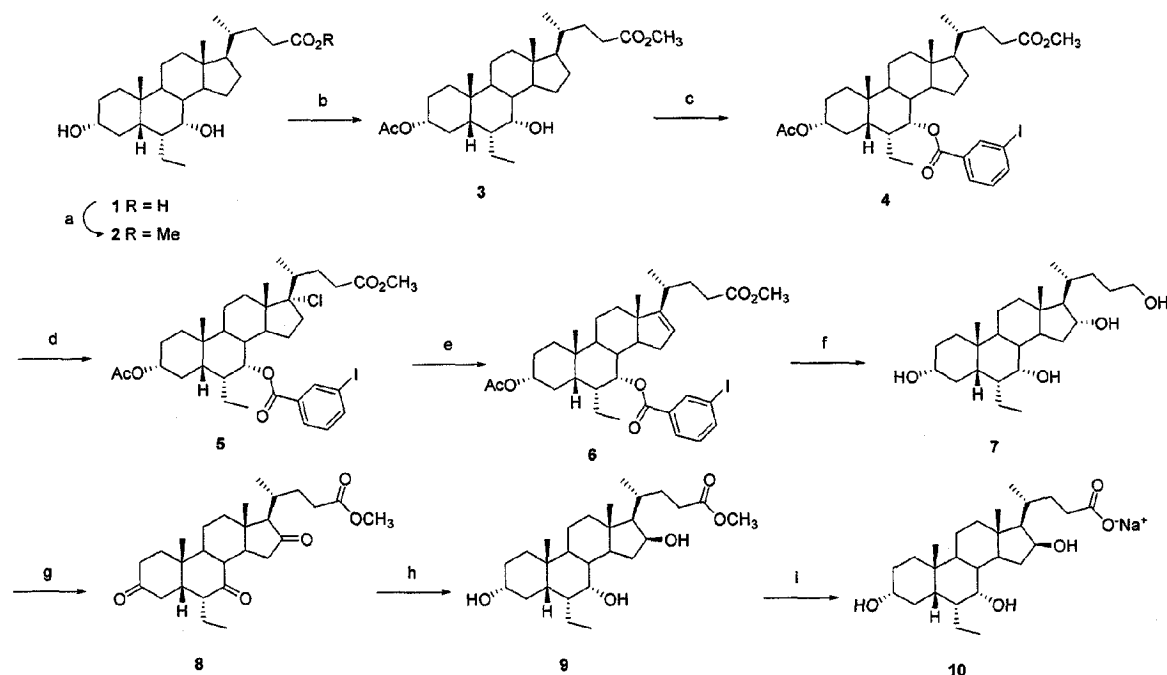
[0126] 在本发明中所引用的全部的公开出版物以及专利文献均通过这样的提及被引入到本发明之中,就好像单独并且具体的指出每一篇这样的公开出版物或者文献均通过这样的提及方式被引入本发明之中。对于公开出版物以及专利文献的引证并不意在作为对任何的相关现有技术的许可,也不构成对其所具有的所述内容或者日期的任何许可。本发明现在通过书写说明书的方式被进行描述,本领域技术人员将能够认识到,本发明可以通过各种不同的实施方式来进行实践并且前述的说明以及下文中的实施例是出于描述的目的并且不能够作为对随后的权利要求书所构成的限制。

[0127] 实施例1:G蛋白偶联受体5(TGR5)调节剂的合成

[0128] 可以通过本领域技术人员已知的方法对本发明中所述的化合物及其相关的衍生物进行合成。

[0129] 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\beta$ -三羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -24-胆烷酸钠盐(10)

[0130]



[0131] 试剂以及条件:a)甲醇,对甲苯磺酰胺(pTSA),超声波,30℃,2小时,93%。b)乙酸酐,碳酸氢钠,四氢呋喃(THF),回流,12小时,99%。c)1,3-碘-苯甲酸,乙二酰氯,二氯甲烷,室温,1小时。2.氢化钙,BnEt<sub>3</sub>N<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>,甲苯,回流,48小时,80%。d)二氯碘苯,叔丁醇,二氯甲烷,高电压,0℃,1小时,91%。e)吡啶,回流,12小时,64%。f)1.氢化硼四氢呋喃(BH<sub>3</sub>THF),室温,2小时。2.过氧化氢,氢氧化钠水溶液,从0℃至室温,3小时。3.氢氧化钾,甲醇,甲苯,回流,12小时,47%。g)1.琼斯试剂,丙酮,从0℃至室温,2小时。2.对甲苯磺酰胺(pTSA),甲醇,超声波,30℃,2小时,55%。h)叔丁基胺-硼烷复合物(<sup>t</sup>BuNH<sub>2</sub>BH<sub>3</sub>),二氯甲烷,室温,24小时,40%。i)氢氧化钠,甲醇,室温,3小时,82%。整体产率:3.6%。

[0132] 3α,7α-二羟基-6α-乙基-5β-24-胆烷酸甲酯(2)

[0133] 向1(4.1克,9.76毫摩)的甲醇溶液(120毫升)中添加对甲苯磺酰胺(pTSA)(0.41克,2.15毫摩)并且在30℃下对所述的混合液进行2小时的超声波降解。在减压条件下蒸发所述的溶剂,将所述的残余物溶解于三氯甲烷(150毫升)之中,利用碳酸氢钠的饱和水溶液(2x 100毫升)、水(100毫升)以及盐水(100毫升)对其进行洗涤。在无水硫酸钠上对所述的有机层进行干燥并且将其蒸发至干燥从而获得以白色固体形式存在的所述的甲酯2(3.95克,9.1毫摩,93%),所述的甲酯不需要进行进一步的纯化即可在随后的步骤中进行使用。

[0134] 3α-乙酰氧基-7α-羟基-6α-乙基-5β-24-胆烷酸甲酯(3)

[0135] 向2(3.9克,8.98毫摩)的新鲜蒸馏的四氢呋喃(THF)溶液(100毫升)中添加乙酸酐(15.29毫升,161.75毫摩)以及碳酸氢钠(15.09克,179.72毫摩)并且将上述得到的混合液进行回流过夜。将所述的混合液冷却至室温,利用水(120毫升)进行稀释并且利用乙酸乙酯(3x 80毫升)对其进行提取。利用水(2x 100毫升)、盐水(100毫升)对上述合并的有机层进行洗涤,通过无水硫酸钠对其进行干燥并且在减压条件下将其蒸发至干燥,从而获得所期望的以白色固体形式存在的被乙酰基化的化合物3(4.25克,8.92毫摩,99%),所述的化合物无需进行进一步的纯化即可被用在接下来的步骤中。

[0136] <sup>1</sup>H-NMR(氘代氯仿)δ:0.65(3H,s,18-CH<sub>3</sub>),0.84-0.93(9H,m,19-CH<sub>3</sub>+21-CH<sub>3</sub>-21,

26-CH<sub>3</sub>), 1.11-1.91(26H, m), 2.00(3H, s, 3-CHOC(O)CH<sub>3</sub>), 2.28-2.36(2H, m), 3.65(3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.70(1H, bs, 7-CH), 4.48-4.59(1H, m, 3-CH).

[0137] 3 $\alpha$ -乙酰氧基-6 $\alpha$ -乙基-7 $\alpha$ -(3'-碘苯甲酰)氧基-5-24-胆烷酸甲酯(4)

[0138] 将3-碘苯甲酸(3.93克, 15毫摩)悬浮于二氯甲烷(30毫升)之中并且在室温下在存在2滴二甲基甲酰胺(DMF)的条件下利用乙二酰氯(3.21毫升, 36.1毫摩)对其进行处理直至所述的混合液开始溶解(大约1小时)。在减压条件下除去挥发性物质并且将因此获得的所述的乙酰基氯溶解于150毫升的甲苯之中并且将其添加到一种搅拌的溶液之中, 其中所述的搅拌溶液是3(4.2克, 8.82毫摩)的甲苯溶液(150毫升)。向上述溶液中, 添加氢化钙(2.66克, 63.5毫摩)以及BnEt<sub>3</sub>N+Cl<sup>-</sup>(0.5克, 2.2毫摩), 并且对所述的混合液进行48小时的回流。在此之后将所述的反应混合液冷却至室温, 在减压条件下蒸发所述的溶剂, 将所述的残余物悬浮于三氯甲烷(200毫升)之中并且对其进行过滤。利用碳酸氢钠的饱和溶液(2x 100毫升)、水(100毫升)、盐水(100毫升)对所述的有机滤液进行洗涤, 通过无水硫酸钠对其进行干燥并且将其蒸发至干燥。通过快速色谱法对所述的残余物进行纯化, 其中使用5-10%的乙酸乙酯的石油醚溶液, 从而生成3.54克(5.01毫摩, 57%)的4以及1.23克(2.58毫摩)的未发生反应的起始物质(转化率80%)。

[0139] <sup>1</sup>H-NMR(氘代氯仿) $\delta$ : 0.67(3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.88-0.92(6H, m, 21-CH<sub>3</sub>, 26-CH<sub>3</sub>), 1.13-1.32(15H, m), 1.7-1.74(5H, m), 1.89-1.91(5H, m), 2.05(3H, s, 3-CHOC(O)CH<sub>3</sub>), 2.18-2.30(2H, m), 3.63(3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 4.60-4.62(1H, m, 3-CH), 5.41(1H, bs, 7-CH), 7.23(1H, dd, J<sub>1</sub>=6.5Hz, J<sub>2</sub>=6.7Hz, 5'-H), 7.94(1H, d, J=6.7Hz, 4'-H), 8.04(1H, d, J=6.5Hz, 6'-H); 8.37(1H, s, 2'-H).

[0140] <sup>13</sup>C-NMR(氘代氯仿) $\delta$ : 11.6, 11.7, 18.2, 20.7, 21.7, 22.2, 23.1, 23.9, 26.8, 27.9, 29.6, 30.8(x2), 34.4, 35.1(2x), 35.5, 39.2, 39.3, 41.3, 42.9, 44.6, 50.6, 51.4, 55.3, 74.2, 74.5, 93.9, 128.9, 130.1, 132.4, 138.6, 141.6, 164.5, 170.3, 174.6.

[0141] 3 $\alpha$ -乙酰氧基-6 $\alpha$ -乙基-7 $\alpha$ -(3'-碘苯甲酰)氧基-17 $\alpha$ -氯-5 $\beta$ -24-胆烷酸甲酯(5)

[0142] 向4(3.5克, 4.95毫摩)的二氯甲烷溶液(280毫升)中添加二氯碘苯(3.38克, 12.4毫摩), 其中在所述的二氯甲烷溶液中含有0.3M的叔丁醇(8.2毫升)。通过通入无水氮气气泡的方式对所述的混合液进行3分钟的去氧化作用。在此之后使用钨丝电灯泡(200瓦)在0℃下对所述的混合液进行1小时的光分解。在此之后在减压条件下对所述的溶剂进行蒸发并且通过快速色谱法对所述的残余物进行快速的纯化, 其中在所述的快速色谱法中利用石油醚/乙酸乙酯(8:2, 体积/体积)对其进行洗脱, 从而生成3.35克(4.52毫摩, 92%)的以白色固体形式存在的17-氯衍生物5。

[0143] <sup>1</sup>H-NMR(氘代氯仿) $\delta$ : 0.81(3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.91(3H, d, J=7.3Hz, 21-CH<sub>3</sub>), 1.0(6H, m, 19-CH<sub>3</sub>+26-CH<sub>3</sub>), 1.12-1.93(24H, m), 2.03(3H, s, 3-CHOC(O)CH<sub>3</sub>), 2.18-2.25(2H, m), 3.65(3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 4.57-4.62(1H, m, 3-CH), 5.40(1H, bs, 7-CH), 7.22(1H, t, J=7.79Hz, 5'-H), 7.91(1H, d, J=7.76Hz, 4'-H), 8.02(1H, d, J=7.7Hz, 6'-H), 8.38(1H, s, 2'-H).

[0144] <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 11.6, 14.4, 14.5, 20.7, 21.6, 22.2, 23.1(x2), 26.7, 28.6, 29.4, 31.7, 34.2(x2), 35.1, 35.4, 39.6, 40.4, 41.1, 41.3, 44.6, 45.2, 49.9, 51.5, 74.1, 74.4, 92.9, 93.9, 128.8, 130.1, 132.3, 138.6, 141.7, 164.9, 170.7, 174.1.

[0145] A<sup>16</sup>3 $\alpha$ -乙酰氧基-6 $\alpha$ -乙基-7 $\alpha$ -(3'-碘苯甲酰)氧基-5 $\beta$ -24-胆烷酸甲酯(6)

[0146] 将所述的17-氯衍生物5(3.3克,4.46毫摩)溶解于无水吡啶(130毫升)之中并且进行回流过夜。在此之后在减压条件下对所述的溶剂进行蒸发并且通过快速色谱法对所述的残余物进行快速的纯化,其中在所述的快速色谱法中利用8:2的石油醚/乙酸乙酯对其进行洗脱,从而生成2.24克(3.18毫摩,72%)的以白色固体形式存在的所期望的石蜡。

[0147]  $^1\text{H-NMR}$ (氘代氯仿) $\delta$ :0.75(3H,s,18-CH<sub>3</sub>),0.89(3H,t,J=7.4Hz,21-CH<sub>3</sub>),0.98(3H,t,J=6.5Hz,26-CH<sub>3</sub>),1.03(1H,s,19-CH<sub>3</sub>),1.11-2.02(22H,m),2.05(3H,s,3-CHOC(O)CH<sub>3</sub>),2.22-2.30(2H,m),3.65(3H,s,COOCH<sub>3</sub>),4.58-4.62(1H,m,3-CH),5.20(1H,bs,7-CH),5.51(1H,s,16-CH),7.21(1H,t,J=7.9Hz,5'-H),7.90(1H,dt,J<sub>1</sub>=7.9Hz,J<sub>2</sub>=1.1Hz,4'-H),8.02(1H,dt,J<sub>1</sub>=7.9Hz,J<sub>2</sub>=1.1Hz,6'-H),8.37(1H,t,J=1.3Hz,2'-H)。

[0148]  $^{13}\text{C-NMR}$ (氘代氯仿) $\delta$ :11.6,15.9,20.6,21.7,21.8,22.1,23.1,26.7,29.6,30.9,31.1,31.7,32.2,34.5,34.9,35.0,35.7,37.9,41.3,44.8,47.5,51.4,51.7,74.1,74.7,93.9,121.4,128.9,130.1,132.3,138.6,141.7,158.5,164.6,170.7,174.4。

[0149] 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,24-四羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -胆烷(7)

[0150] 将所述的石蜡6(0.3克,0.42毫摩)溶解于0℃下的氢化硼-四氢呋喃(以10.6毫升,1M的水平存在于四氢呋喃之中)并且在此之后在室温下进行2小时的搅拌。在此时间之后将所述的反应混合物在0℃下进行冷却并且向其中逐滴加入4M氢氧化钠水溶液(20毫升)以及过氧化氢(20毫升)的混合液,并且在这一温度下对上述得到的混合液进行3小时的搅拌。利用1N的盐酸对所述的反应混合液进行酸化并且利用二氯甲烷(3x 60毫升)对其进行提取。通过无水硫酸钠对上述合并的有机层进行干燥并且在减压条件下将其蒸发至干燥。将上述的油性残余物溶解于甲苯之中(52毫升),向其中加入5%的氢氧化钾的甲醇溶液(7毫升)并且对上述得到的混合液进行回流过夜。在减压条件下除去所述的溶剂,将所述的残余物溶解于水(25毫升)中并且利用乙酸乙酯(3x 30毫升)对其进行提取。通过无水硫酸钠对上述合并的有机层进行干燥并且在减压条件下将其蒸发至干燥。通过快速色谱法对所述的残余物进行纯化,其中在所述的快速色谱法中利用乙酸乙酯/乙醇(95:5,体积/体积)对其进行洗脱,从而生成0.085克(0.2毫摩,47%)的以白色固体形式存在的所期望的呋喃(tetrol)。

[0151]  $^1\text{H-NMR}$ (氘代氯仿) $\delta$ :0.64(3H,s,18-CH<sub>3</sub>),0.85-0.91(6H,m,19-CH<sub>3</sub>+26-CH<sub>3</sub>),0.92(3H,d,J=6.4Hz,21-CH<sub>3</sub>),1.21-1.91(21H,m),3.33-3.35(1H,m,3-CH),3.54-3.61(3H,m,7-CH+24-CH<sub>2</sub>),3.94(1H,bs,16-CH)。

[0152]  $^{13}\text{C-NMR}$ (氘代氯仿) $\delta$ :11.7,13.1,14.1,18.8,20.4,21.9,22.4,23.1,28.7,30.4,31.8,33.1,33.5,34.0,35.4(x2),35.5,35.8,39.5,39.9,41.3,43.9,45.3,47.4,62.6,66.1,70.6,72.0。

[0153] 3,7,16-三氧代-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -24-胆烷酸甲酯(8)

[0154] 在0℃下,向呋喃7(0.19克,0.45毫摩)的丙酮搅拌溶液(25毫升)中逐滴的加入琼斯试剂(2毫升)并且在室温下对所述的混合液进行1小时的搅拌。在此之后向其中加入甲醇(8毫升)并且利用乙酸乙酯(2x 50毫升)对上述的氧化产物进行提取。通过无水硫酸钠对上述合并的有机层进行干燥并且在减压条件下将其蒸发至干燥。将所述的残余物溶解于甲醇(80毫升)之中,向其中加入对甲苯磺酰胺(pTSA)并且在室温下对所述的混合液进行2小时搅拌。在减压条件下对所述的溶剂进行蒸发,将所述的残余物溶解于三氯甲烷(50毫升)之中,利用碳酸氢钠的饱和溶液(2x 50毫升)、水(50毫升)以及盐水(50毫升)对其进行洗涤。

通过无水硫酸钠对所述的有机层进行干燥并且将其蒸发至干燥。利用快速色谱法对所述的残余物进行纯化,其中使用到20%至30%的乙酸乙酯的石油醚溶液,从而获得以发白色的固体形式存在的所述甲酯8(0.115克,0.26毫摩,58%)。

[0155]  $^1\text{H-NMR}$ (氘代氯仿) $\delta$ :0.82(3H,s,18-CH<sub>3</sub>);0.85(3H,m,26-CH<sub>3</sub>);1.0(3H,d,J=6.5Hz,21-CH<sub>3</sub>);1.37(3H,s,19-CH<sub>3</sub>);1.55-2.35(23H,m);2.63-2.87(2H,m)。

[0156] 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\beta$ -三羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -24-胆烷酸甲酯(9)

[0157] 向所述的三酮基酯8(0.1克,0.22毫摩)的二氯甲烷溶液(8毫升)中添加叔丁基胺-硼烷复合物(0.1克,1.12毫摩)并且对所述的反应混合物进行回流过夜。将所述的反应混合液冷却至室温并且向其中加入3N的盐酸并且对上述得到的混合液进行30分钟的搅拌。对所述的有机层进行分离,利用碳酸氢钠的饱和水溶液(10毫升)、水(10毫升)对其进行洗涤,通过无水硫酸钠对其进行干燥并且将其蒸发至干燥。将所述的残余物溶解于1:4体积/体积的水/四氢呋喃(THF)混合液(5毫升)之中并且在0℃下向其中加入硼氢化钠,其中在所述的残余物中所述的7-酮没有被还原。将所述的混合液在室温下进行30分钟的搅拌,在此之后向其中加入水(5毫升)以及3N的盐酸(5毫升)。利用乙酸乙酯(4x 30毫升)对所述的混合液进行提取,通过无水硫酸钠对上述合并的有机层进行干燥并且在减压条件下将其蒸发至干燥。利用快速色谱法对所述的残余物进行纯化,其中所述的残余物是由至少两种组分所组成的,在所述的快速色谱法中使用到1%至4%的甲醇的三氯甲烷溶液,从而生成了0.036克(0.08毫摩,36%)的所期望的化合物9。

[0158]  $^1\text{H-NMR}$ (丙酮-d<sub>6</sub>) $\delta$ :0.87-0.90(6H,m,18-CH<sub>3</sub>+26-CH<sub>3</sub>),0.92(3H,s,19-CH<sub>3</sub>),0.98(3H,d,,J=6.4Hz,21-CH<sub>3</sub>),1.19-1.58(10H,m),1.75-2.05(7H,m),2.34-2.41(2H,m)3.28-3.30(1H,m,3-CH),3.62(3H,s,COOCH<sub>3</sub>),3.64(1H,bs,7-CH),4.37(1H,bs,16-CH)。

[0159]  $^{13}\text{C-NMR}$ (丙酮-d<sub>6</sub>) $\delta$ :11.1,12.5,17.4,20.4,22.3,22.8,30.1,30.4,30.5,30.6,33.1,33.7,35.4,35.6(x2),39.7,40.0,41.6,42.2,45.7,48.3,50.8,61.7,69.5,71.3,71.4,174.8。

[0160] 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\beta$ -三羟基-6 $\alpha$ -乙基-5 $\beta$ -24-胆烷酸钠盐(10)

[0161] 将所述的酯9(35毫克,0.08毫摩)溶解于8毫升的5%的氢氧化钠的甲醇溶液之中并且在室温下对上述得到的混合液进行搅拌过夜。在减压条件下对所述的溶剂进行蒸发,上述得到的固体存在于水/甲醇(1:1)的混合液之中并且利用逆相色谱法(柱RP-181obar A)对其进行纯化,其中使用甲醇/水(5:5至7:3)的混合液作为流动相,从而得到所期望的钠盐10(15毫克,0.03毫摩,43%)。

[0162]  $^1\text{H-NMR}$ (氘代甲醇) $\delta$ :0.86(3H,s,18-CH<sub>3</sub>),0.88-0.93(6H,m,19-CH<sub>3</sub>+26-CH<sub>3</sub>),0.99(3H,d,J=6.4Hz,21-CH<sub>3</sub>),1.06-1.41(9H,m),1.46-1.9(11H,m),1.97-2.04(2H,m),2.23-2.25(2H,m),2.30-2.35(1H,m),3.28-3.35(1H,m,3-CH),3.67(1H,bs,7-CH),4.49-4.52(1H,m,16-CH)。

[0163]  $^{13}\text{C-NMR}$ (氘代甲醇) $\delta$ :12.0,13.3,18.7,21.6,23.5,23.7,29.5,31.2,31.3,33.4,34.4,34.5,35.3,35.5,36.6,36.7,41.2,43.1,43.4,46.7,63.8,71.1,73.2,73.4。

[0164] 实施例2:G蛋白偶联受体5(TGR5)以及法尼酯X受体(FXR)的体外活性

[0165] 实施例2A:G蛋白偶联受体5(TGR5)与法尼酯X受体(FXR)受体的结合

[0166] 使用体外检测的方法对本发明中所述的化合物对于G蛋白偶联受体5(TGR5)受体

所具有的效能和功效。表格1概括的是本发明中所述的化合物对法尼酯X受体(FXR)受体以及G蛋白偶联受体5(TGR5)受体所具有的效能和功效。

[0167] 表格1

[0168]

|            | $\alpha$ 筛选检测                                                  | 荧光共振能量转移 (环化腺核苷一磷酸) NCI-H716                                   | 转化作用检测                                                         | 存在于过表达 G 蛋白偶联受体 5 的人胚肾上皮细胞 293 细胞中的荧光共振能量转移-环化腺核苷一磷酸             |
|------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 化合物 (对照标准) | 人类法尼酯 X 受体<br>(CDCA=10-20 $\mu$ M) EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | 人类 G 蛋白偶联受体 5<br>(LCA=4-8 $\mu$ M) EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | 人类 G 蛋白偶联受体 5<br>(LCA=1-6 $\mu$ M) EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | 人类 G 蛋白偶联受体 5<br>(LCA=0.3-5 $\mu$ M) EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
| 化合物 10     | 12                                                             | 0,65                                                           | 0,04                                                           | 0,2                                                              |

[0169] 荧光共振能量转移检测(对细胞内环化腺核苷一磷酸的水平进行检测)

[0170] 通过使用荧光共振能量转移(FRET)检测对所述的环化的腺核苷一磷酸(cAMP)所具有的水平进行测量的方式来实现所述的受体结合检测。将人类肠内细胞系(NCI-H716)以 $12 \times 10^3$ 个细胞/孔的密度放置于96孔培养板内,其中所述的培养板在即将被使用前依照制造商的说明书利用0.75毫克/毫升的基质胶(BD生物科学)进行了涂覆,所述的细胞存在于DMEM之中,在所述的DMEM之中补充有10%(体积/体积)的胎牛血清(FBS),100单位/毫升的青霉素以及100微克/毫升的硫酸链霉素,并且对所述的细胞进行24小时的培养,这允许细胞粘附在所述培养板的底部上。利用磷酸盐缓冲液(PBS)对所述的细胞进行两次洗涤并且将培养基调换为环化腺核苷一磷酸(cAMP)检测培养基[OPTIMEM,其中含有0.1%(重量/体积)的牛血清白蛋白以及1毫摩的3-异丁基-1-甲基黄嘌呤]。经过在37℃下培养60分钟之后,在室温下利用存在于刺激缓冲液(5毫摩的羟乙基哌嗪乙磺酸,0.1%的牛血清白蛋白的Hank平衡盐溶液,pH7.4)之中的增加浓度的化合物10对所述的细胞进行1小时的处理,其中在所述的刺激缓冲液中含有所述的铈螯合物——链霉亲和素以及ALEXA Fluor 647共轭抗体抗环化腺核苷一磷酸(cAMP)(PerkinElmer)。利用Lance试剂盒(PerkinElmer)对所述的细胞内环化腺核苷一磷酸(cAMP)所具有的水平进行确定。石胆酸被用来作为对照的配体。Z'因子被用来对检测进行验证。通过使用四个参数的方程以及GraphPad Prism软件(GraphPad Inc.)展现出不受约束的非线性回归曲线,从而获得了所述的EC50值。

[0171]  $\alpha$ 筛选检测

[0172] 通过在一项辅助激活剂补充检测中使用 $\alpha$ 筛选技术的方式对在法尼酯X受体(FXR)上所具有的活性进行检测。 $\alpha$ 筛选是一项基于珠的化学检测,其被用来研究生物分子的相互作用。在所述的珠上捕获到的分子的结合导致了一种能量从一个珠向其他珠上的转移,最终生成了一种发光信号。当所述的参与者发生相互作用时,化学能量从供体珠转移到受体珠上并且由此生成了一种信号。当受到胆汁酸的刺激作用时,所述的谷胱甘肽转移酶-法尼酯X受体-配体结合结构域(GST-FXR-LBD)与所述的Scr-1肽发生了相互作用。抗谷胱甘肽转移酶(GST)涂覆的受体珠被用来捕获所述的谷胱甘肽转移酶(GST)融合蛋白法尼酯X受体-配体结合结构域(FXR-LBD)而所述的生物素化的SRC-1肽通过所述的链霉亲和素供体珠而被捕获。当在680纳米处发光时,从供体珠向受体珠进行转移的化学能量穿过了所述的复合

物链霉素亲和素-供体/Src-1-生物素/谷胱甘肽转移酶法尼酯X受体-配体结合结构与(GSTFXR-LBD)/抗-谷胱甘肽转移酶(GST)-受体并且由此生成了一种信号。所述的检测是在白色的、小容量的、384孔的Optiplate培养板(PerkinElmer)内实现的,其中使用了最终体积为25微升的含有最终浓度为10纳摩的纯化的谷胱甘肽转移酶(GST)标记的法尼酯X受体-配体结合结构与(FXR-LBD)蛋白,30纳摩的生物素化的Src-1肽,20微克/毫升的抗-谷胱甘肽转移酶(GST)受体珠以及10微克/毫升的链霉素亲和素供体珠(PerkinElmer)。所述的检测缓冲液中含有50毫摩的Tris(pH7.4),50毫摩的氯化钾,0.1%的牛血清白蛋白(BSA),以及1毫摩的二硫苏糖醇(DTT)。利用1微升的配体(溶解于100%的二甲基亚砷中)所进行的刺激作用的时间被固定为室温下30秒钟。将存在于每一个孔内的所述的二甲基亚砷(DMSO)所具有浓度保持在4%的最终浓度上。在进行了所述的检测混合物(受体珠以及供体珠)的添加之后,在室温下于黑暗中对所述的培养板进行4小时的培养并且在此之后利用一个Envision微滴定板分析仪(PerkinElmer)对其进行读数。以一式三份的形式给出剂量应答曲线并且Z'因子被用来对所述的检测进行验证。通过使用四个参数的方程以及GraphPad Prism软件(GraphPad Inc.)展现出不受约束的非线性回归曲线,从而获得了所述的EC50值。

[0173] 细胞的培养,转染以及荧光素酶检测

[0174] 使人类肝细胞HEPG2以及人胚肾上皮细胞HEK293T细胞分别在E-MEM以及DMEM中进行培养,它们其中可以任意补充有1%的青霉素/链霉素,1%的L-谷氨酸盐以及10%的胎牛血清(高葡萄糖)(Invitrogen,Carlsbad,CA)。让细胞在37℃下于5%的二氧化碳中进行生长。全部的转染均是使用5:2的Fugene HD转染试剂(微升)分别向所述的DNA(微克)中进行的(Roche)。在进行转染的24小时之前,分别以10000个细胞/孔或者15000个细胞/孔的密度将人胚肾上皮细胞293T(HEK293T)或者人肝细胞(HepG2)接种至96孔培养板上。使用100纳克的受体载体pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro](Promega),40纳克的pGL4.74(Renilla),以及10纳克的表达质粒pCMV-SPORT6-hTGR5 The NIH Mammalian Gene Collection clone(美国国立卫生研究院哺乳动物基因保藏克隆MGC:40597(Invitrogen)来实现瞬间转染,其中40纳克的pGL4.74(Renilla)被用来作为转染效率的内在对照。添加所述的pGEM载体从而对在每一次检测中被转染的所述DNA的剂量(2微克)进行正态化。在经过转染的24小时之后,利用增加浓度的化合物10对所述的细胞进行18小时的刺激。对照培养物仅接受了溶媒(0.1%的二甲基亚砷)。在此之后通过向含有75微升培养基的细胞/孔内添加75微升的Dual-Glo荧光素酶试剂(Promega)的方式对所述的细胞进行溶解。通过添加体积/体积的Dual-Glo Stop & Glo试剂以及最初的培养基的方式对海肾荧光素酶的活性进行测量。荧光素酶活性被表示为荧光素酶单位与海肾荧光素酶单位之间的比例。每一个数据点代表的是三次检测的平均值。每一次试验至少被重复进行三次。

[0175] 50%有效浓度(EC50)以及功效的测定

[0176] 通过分别对10微摩的石胆酸(LCA)的数值所占的百分比以及10微摩的鹅脱氧胆酸(CDCA)的数值所占的百分比进行计算的方式可以对功效进行确定,其中所述的石胆酸(LCA)数值是针对G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂的研究,鹅脱氧胆酸(CDCA)数值是针对法尼酯X受体(FXR)激动剂的研究。在减去所述的基础(溶媒处理的)条件的平均值之后,将数值应用于EC<sub>50</sub>和/或功效的计算中。在将其转化成为对数之后,完成了对平均的EC<sub>50</sub>的计算

以及对各种不同的化合物所具有的EC<sub>50</sub>所进行的比较。

**[0177] 实施例2B: 化合物10的G蛋白偶联受体5(TGR5)靶向基因表达检测**

**[0178]** 使用化合物10对肠内NCI-H716细胞中的ACC以及AMPK基因表达所具有的水平进行测量,并且使用石胆酸(LCA)作为阳性对照。利用实时聚合酶链式反应(Q-RT-PCR)对所述的G蛋白偶联受体5(TGR5)靶向基因所具有的mRNA表达水平进行测量。总RNA是从NCI-H716细胞中分离出来的(金总RNA袖珍试剂盒BioRad),其中利用5微摩的化合物10对所述的细胞进行了18小时的刺激。在20微升的反应体积内,利用ISCRIPt cDNA合成试剂盒(BioRad)对所述的RNA进行随机的逆转录。十纳克的模板被用在20微升的最终体积的实时聚合酶链式反应(PCR)中,其中含有0.3微摩的每一种引物以及10微升的两倍的SYBR Green PCR Master MIX(Bio-Rad)。所有的反应都是以一式三份的方式来完成的,并且所述的热循环条件为:于95℃下3分钟,此后进行45次于95℃下10秒钟的循环,以及于60℃下30秒钟,上述热循环是发生在iCycler iQ5仪器(Biorad, Hercules, CA)内的。对每一个样本的复制所具有的平均值进行计算并且将其表示为循环阈值(CT:每一次聚合酶链式反应达到一个预先确定的荧光阈值所经历的循环数量,设定在所有反应的线性范围之内)。在此之后对所述的基因表达所具有的剂量进行计算,将所述的剂量作为存在于所述样本针对所述的靶向基因而言所具有的循环阈值(CT)数值与这一样本针对所述的内生性的对照β-微球蛋白而言所具有的平均循环阈值(CT)数值之间的差值( $\Delta$ CT)。对于每一种靶向基因而言,将存在于所述的受试样本的 $\Delta$ CT数值与所述的对照样本(野生型)(WT)的 $\Delta$ CT数值之间的差值( $\Delta\Delta$ CT)作为相对表达来进行计算。所述的相对数量值被表达和表示为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。使用所述的软件Beacon Designer将所有的聚合酶链式反应(PCR)引物设计成为跨越基因内区的,其是存在于来自于所述的美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中的公开序列数据上的。在附图3中对所述的结果进行了表示。

**[0179] 实施例2C: 在人类肠细胞系以及肝细胞系中化合物10所具有的体外细胞毒性**

**[0180]** 使用PerkinElmer三磷酸腺苷(ATP)-Lite 1STEP对细胞的存活能力进行测量。三磷酸腺苷(ATP)是一种用于细胞存活能力的标记物,因为它存在于所有的代谢活性细胞之中并且当所述的细胞经受到细胞坏死或者细胞凋亡时所述的三磷酸腺苷(ATP)所具有的发生快速的下降。将人类NCI-H716细胞或者肝细胞(HepG2)细胞( $1 \times 10^4$ )接种于96孔培养板内并且在37℃下利用10倍的所述化合物10的稀释液对其进行4小时的刺激,其中所述的化合物10从1纳摩至300微摩。在室温下对所述的培养板进行10分钟的平衡并且向含有细胞的100微升的培养基中添加100微升的三磷酸腺苷(ATP)-Lite 1STEP试剂。利用Victor Light(PerkinElmer)对发光情况进行读取。从背景中减去所述的试验信号。他莫昔芬被用来作为细胞毒性的阳性对照,而未经处理的细胞被用来作为阴性对照。所述的结果在附图4以及附图5中被示出。

**[0181] 实施例3: 本发明中所述的化合物在一种膳食诱导的肥胖症小鼠模型中所具有的代谢活动**

**[0182]** 这项研究的目的在于确定G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂(齐墩果酸(OA)或者本发明中所述的化合物(例如,一种“受试化合物”))是否能够对体内的肥胖症以及相关的胰岛素抗性的形成进行纠正。为了对这种可能性进行检验,向雄性C57BL6J小鼠施用16周的齐墩果酸(OA)/受试化合物,其中所述的小鼠预先接受了10周的高脂肪饮食,所述的施用是经由

食品施用的方式来进行的。

[0183] II-方案

[0184] 在一项先前的研究中,已经观察到齐墩果酸(OA)可以作为一种选择性的G蛋白偶联受体5(TGR5)激动剂,所述的激动剂不能够引发食物厌恶。然而,利用100毫克/千克/天的剂量的齐墩果酸(OA)进行处理的动物表现出某些毒性的迹象,而较低的剂量则表现出了很好的耐受性。在这项研究中,齐墩果酸(OA)是以50毫克/千克/天的剂量被进行施用的。

[0185] 体外的研究已经识别出本发明中所述的化合物是一种有效的以及选择性的G蛋白偶联受体5(TGR5)配体。本发明中所述的化合物不会被认为存在毒性的问题,其中所述的化合物是以大约50倍的低浓度水平杯进行施用的。

[0186] 在这项研究中,将48只雄性C57BL6J小鼠(5周大小)划分成两组:一组中的24只(第1组,第2组,第3组)接受正常的饮食,而另外一组中的24只接受了为期十周的高脂肪饮食(第4组,第5组,第6组)。在此之后在为期十六周的时间内对所述的动物进行分析。按照下述方式对五组十只动物进行分配:

[0187] 1:正常饮食

[0188] 2:正常饮食+50毫克/千克/天的齐墩果酸(OA)

[0189] 3:正常饮食+受试化合物,例如,30毫克/千克/天

[0190] 4:高脂肪饮食

[0191] 5:高脂肪饮食+50毫克/千克/天的齐墩果酸(OA)

[0192] 6:高脂肪饮食+受试化合物,例如,30毫克/千克/天

[0193] 在整个的研究过程中,对体重以及食物的摄取进行每周两次的监测。

[0194] 第-2周:针对所有的组,通过双重能量X-射线吸光测定法(dexascan)对机体组成进行分析。

[0195] 第-1周:经过12小时的禁食时间段之后,在所有的组中对转氨酶、葡萄糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)以及胰岛素所具有的血清水平进行测量,并且在此之后按照指示对小鼠进行饮食处理(第0天)。

[0196] 第2周:经过12小时的禁食时间段之后,在所有的组中对转氨酶、葡萄糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)以及胰岛素所具有的血清水平进行测量(第14天)。

[0197] 第4周:通过使所有动物接受腹膜内葡萄糖耐受性测试(IPGTT)的方式对葡萄糖耐受性进行确定。在进行这项测试之前,动物要进行12小时的禁食。通过间接量热法对第1组、第4组、第5组以及第6组(正常饮食,高脂肪饮食以及高脂肪因素齐墩果酸/受试化合物)所产生的静息能量消耗进行测量。

[0198] 第8周:针对所有的组,通过双重能量X-射线吸光测定法(dexascan)对体重的组成进行再一次的分析。经过12小时的禁食时间段之后,在所有的组中对转氨酶、葡萄糖、甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)以及胰岛素所具有的血清水平进行测量(第56天)。

[0199] 第9周:在为期30小时的时间段内,对第4组、第5组以及第6组(高脂肪饮食饲喂的小鼠)所具有的生理节奏活动进行研究。

[0200] 第10周:对第4组、第5组以及第6组进行血压以及心率的测量。

[0201] 第11周:在上午10点钟时,在室温下对所有动物所具有的直肠温度进行测量。对第1组、第2组、第3组以及第4组所具有的生理节奏活动进行测量。

[0202] 第12周:在第4组、第5组以及第6组中,通过进行一种腹膜内葡萄糖耐受性测试(IPGTT)的方式对葡萄糖耐受性进行分析。在所述的腹膜内葡萄糖耐受性测试(IPGTT)的过程中,同样对血液进行收集用以分析胰岛素水平。在进行这些测试之前对动物进行12小时的禁食。在24小时的时间段内对所有组的粪便进行收集并且对粪便中的脂质含量进行测量。

[0203] 第16周:对所有的动物进行寒冷测试,这是通过对被暴露于4℃的温度下的动物进行体温测量的方式来实现的。

[0204] 三天之后,将动物处死。在处死时,收集血液并且对下述进行分析:血浆的脂质(TC,TG,高密度脂蛋白胆固醇,游离脂肪酸);肝脏功能(谷丙转氨酶,谷草转氨酶,碱性磷酸酶, $\gamma$ -谷氨酰基转移酶);葡萄糖以及胰岛素;选定的血浆团的脂蛋白曲线(尺寸排除色谱法)。

[0205] 对肝脏,小肠,脂肪组织(白色脂肪组织(WAT)以及棕色脂肪组织(BAT)),胰腺,心脏以及肌肉进行收集,称重并且将其保留用以进行进一步的分析,其中所述的进一步的分析包括:标准组织学分析(苏木素伊红(HE)染色,琥珀酸盐脱氢酶染色,油红O染色以及细胞形态学分析);组织脂质含量分析;在棕色脂肪组织(BAT)以及肌肉上进行电子显微镜线微分析用以对线粒体进行分析;RNA的分离,用以对选定的基因进行表达研究,其中所述的选定的基因参与了代谢与能量的动态平衡,所述的表达研究是通过定量实时聚合酶链式反应(RT-PCR)来实现的;蛋白质的提取,用于进行对翻译后的修饰的研究,其中所述的翻译后的修饰例如是目标蛋白质(例如,真皮层再生还原诱导蛋白-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ ))的乙酰基化作用。

[0206] III-详细的操作步骤

[0207] A-动物的处理以及膳食

[0208] 动物的容纳以及处理

[0209] 依照欧洲共同体(European Community)的规范,将小鼠分组容纳于(5只动物/笼)特定的不含有病原体的条件中,其中在所述的条件下具有12小时:12小时(开始于7点)的光照-黑暗循环,在一个温度(20-22℃)以及湿度受控的动物园内。动物们被允许自由取食水以及食物。

[0210] 饮用水

[0211] 在Institut d'Hydrologie,UPL,斯特拉斯堡对所述的自来水所具有的化学组成进行有规律的分析,用以验证其中不存在可能的毒性物质。利用盐酸以及高氯酸对饮用水进行处理从而将pH维持在5至5.5之间,并且氯的浓度存在于5ppm至6ppm之间。

[0212] 饮食

[0213] 标准的啮齿动物类的正常饮食是从UAR处获得的而所述的高脂肪饮食是从Research Diet处获得的。利用正常的饮食(16%的蛋白质,3%的脂肪,5%的纤维,5%的灰分)或者利用高脂肪饮食(20%的蛋白质,20%的碳水化合物,60%的脂肪)对小鼠进行饲养。将粉末状的正常饮食或者粉末状的高脂肪饮食与齐墩果酸以及受试化合物进行混合,其中所述的混合是以下述的比例来实现的:0.5克的齐墩果酸(OA)/千克食物,用于进行50毫克/千克/天的处理,以及0.08克的受试化合物/千克食物,用于进行10毫克/千克/天的处

理。在此之后重新构成小球。对照组接受的是不含有受试化合物或者齐墩果酸(OA)的食物小球。由于所述的高脂肪饮食所具有的粘稠度,在含有齐墩果酸(OA)的混合物中不需要加入水。在所述的正常饮食的情形中,较为难以进行重新构建,向所述的粉末中添加最小剂量的水,用以重新构建成小球,其中所述的水在此之后被进行空气干燥。每周制备一批新的食物。

[0214] 血液的收集

[0215] 可以在麻醉条件下从所述的眼球后静脉窦中收集血液,或者从所述的尾部静脉内收集血液。

[0216] 麻醉

[0217] 为了进行所述的双重能量X-射线吸光测定法扫描试验,利用克他命(200毫克/千克)/二甲苯胺噻嗪(10毫克/千克)的混合液对动物实施麻醉,其中所述的混合液是通过腹膜内注射的方式来进行施用的。为了进行所述的静脉穿刺,通过吸入一种异氟烷-氧气混合物的方式对动物实施麻醉。

[0218] B-生物化学

[0219] 利用Olympus AU-400自动化试验室工作站来实现所述的测试,其中使用的是可商业购买的试剂(Olympus)。

[0220] 脂质以及脂蛋白的分析

[0221] 通过酶法检测对血清甘油三酯,总胆固醇以及高密度脂蛋白(HDL)胆固醇进行测定。在利用磷钨酸/镁(例如,Roche Diagnostics,曼海姆,德国)对含有载脂蛋白B的脂蛋白进行沉淀之后,对血清中的高密度脂蛋白(HDL)胆固醇的含量进行测定。利用来自于Wako(例如,诺伊斯,德国)的试剂盒对游离脂肪酸的水平进行测定,其中所述的测定是按照提供者的规定来进行的。

[0222] 代谢作用以及内分泌的探索

[0223] 利用一种Precision Q.I.D分析仪(例如,Medisense系统)对血液的葡萄糖浓度进行测量,其中使用的是Medisense Precis电极(例如,Abbot实验室,Medisense制造,贝德福德,美国)。通过利用经典的葡萄糖测量值与Precision Q.I.D分析仪数值进行比较的方式对这种方法进行验证。之所以选择所述的Precision Q.I.D方法是因为它需要最小剂量的血液并且能够因此被用于多种的测量方法中例如被用于一个腹膜内葡萄糖耐受性测试(IPGTT)过程之中。根据制造商的说明书,通过酶联免疫吸附检测(ELISA)对血浆胰岛素(例如,Mercodia,乌普萨拉,瑞典)进行测定。

[0224] C-代谢测试

[0225] 脂蛋白曲线

[0226] 脂蛋白曲线是通过快速蛋白质液相色谱法来获得的,这种方法允许对所述的三种主要的脂蛋白类型进行分离,其中所述的脂蛋白类型是:极低密度脂蛋白(VLDL),低密度脂蛋白(LDL),以及高密度脂蛋白(HDL)。

[0227] 腹膜内葡萄糖耐受性测试(IPGTT)——口服葡萄糖耐受性测试

[0228] 对小鼠实施腹膜内葡萄糖耐受性测试(IPGTT),其中所述的小鼠经过了过夜(12小时)的禁食。任选的通过腹膜内(IPGTT)注射的方式利用20%的葡萄糖的无菌生理盐水溶液(0.9%的氯化钠)对小鼠进行注射,其中所述的注射是在2克葡萄糖/千克体重的条件下进

行的。从所述的尾部静脉内收集血液,用于进行葡萄糖以及胰岛素的监测,其中所述的收集是在进行所述的葡萄糖溶液的施用之前以及在经过所述的葡萄糖溶液的施用之后的15分钟、30分钟、45分钟、75分钟、90分钟、120分钟、150分钟、180分钟时进行的。所述的葡萄糖曲线所具有的增加的面积被计算为一种胰岛素敏感度的测量值,而所述的相应的胰岛素水平指示着胰岛素分泌的储备。

#### [0229] 能量消耗

[0230] 通过间接量热法对能量消耗进行评价,这是通过利用所述的Oxymax装置(例如,Columbus Instruments,哥伦布,俄亥俄州)在12小时的过程中对氧气的消耗量进行测量的方式来实现的。这种系统是由一个开放的回路所组成的,在所述的回路中空气可以进入并且流出塑胶笼(每个笼内一只小鼠)。动物被允许自由摄取食物和水。利用一种非常精确的二氧化碳以及氧气传感器对存在于两种空气体积内的氧气以及二氧化碳的浓度的差异进行测量,假定进入到所述的笼内的空气所具有的空气流速是恒定的,则所述的传感器能够给出在一段时间内所消耗的所述氧气的剂量。在一台相连接的计算机上对来自于所述的装置中的所述数据进行处理,分析,并且将其表示在一个可以输出的Excel文件中。所述的数值被表示为毫升/千克/小时,这普遍被认为是V02。

#### [0231] 通过双重能量X-射线吸光测定法进行机体脂肪含量的测定

[0232] 利用所述的超高分辨率的PIXIMUS系列显像密度计(0.18x0.18毫米像素,GE Medical Systems,麦迪逊,威斯康星州,美国)来实现所述的双重能量X-射线吸光测定法(Dexa)分析。通过所述的PIXIMUS软件(版本1.4x,GE Medical Systems)对骨矿物质密度(BMD,单位为克/平方厘米)以及机体的组成进行测定。

#### [0233] D-非侵入性血压测量法以及脉搏

[0234] 所述的Visitech BP-2000血压分析系统是一种计算机自动尾套系统,所述的血压分析系统被用来在不进行手术干预的情况下同时对四只觉醒的小鼠进行多种测量值的获取。所述的小鼠被容纳在单独的黑暗腔室内,所述的黑暗腔室存在于一个被加热的平台之上,其中所述的小鼠的尾巴被套入一个尾套之中。所述的系统通过对所述的尾套所具有的压力进行测量的方式对血压进行测量,其中在所述的尾套中,所述的血液向尾巴处的流动被排除了。一个光电传感器对所述的样本所具有的脉搏进行检测。所述的系统能够生成这样的结果,所述的结果已经表现出与平均动脉内压力是紧密相符的,其中所述的平均动脉内压力是在所述的颈动脉内同时测量得到的。这使得可以获得可再现的心脏收缩血压以及心搏速率。这需要在所述的系统对所述的动物进行为期一周的训练。

#### [0235] E-生理节奏活动

[0236] 使用单独的箱子对自发性的运动活动进行测量,其中每一个箱子是由一个可以滑动的地板、一个可以分离的笼子所构成的,并且装配有红外线捕获器,从而允许对走动性的运动活动以及暴跳进行测量。使用一种电子界面(例如,Imetronic,Pessac,法国)将箱子与一台计算机进行连接。为了测量对所述装置的适应度以及夜间的活动和白天的活动,对小鼠进行32小时的测试。使用一台自动lickometer在所述的测试阶段过程中对所消耗的水的数量进行测量。

#### [0237] 实施例4:物理化学性质

#### [0238] 水溶性

[0239] 将固态的胆汁酸(BA)悬浮于5毫升0.1M的盐酸之中。经过1周的培养以及轻柔的搅拌之后,在Millopore过滤器(0.22 $\mu$ m)上对所述的饱和溶液进行过滤并且通过高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)对所述的胆汁酸(BA)所具有的浓度进行测量,其中使用到C18柱(150毫米x 2毫米内径,4微米),以及含有15毫摩pH为5的乙酸和乙腈的水作为流动相。所述的流动速率为150微升/分钟。在所述的多重反应监测模式下实现所述的质谱测量捕获,其中使用了在负性电离中的所述的电喷雾电离(ESI)源。水溶性被表示为微摩/升。

[0240] 在pH为1的情况下对经过羧酸化处理的胆汁酸的不溶性质子化种类所具有的水溶性进行测量。所述的化合物10所具有的水溶性为120微摩(参见表格2)。

[0241] 在所述的化合物10中,一个羟基所存在的位置不同(16-位置)能够些许的降低所述的溶解性,这种降低是相较于传统的3,7,12三羟基胆汁酸而言的。通过对所述的pH的增加能够使所述的水溶性增强,并且在pH为7时化合物10是高度水溶的。表格2中的所述数据表示的是:当其以酸的形式被进行施用,所述的经过羧酸化的相似化合物10在所述的胃内容物中是保持不溶性的,并且一旦其被分泌至所述的十二指肠内时开始发生溶解从而形成所述的盐(阴离子),这是因为在所述的胰腺流体以及十二指肠流体中存在的较高的pH。在胆汁中,所述的化合物保持溶解并最终在高浓度的水平形成了胶束。

[0242] 表格2

[0243]

| 胆汁酸                | Ws <sup>(a)</sup><br>(微摩) | CMC <sup>(b)</sup><br>0,15 M Na <sup>+</sup><br>(毫摩) | ST <sub>CMC</sub> <sup>(c)</sup><br>Dyne/cm | LogP <sub>A</sub> <sup>(d)</sup> | 白蛋白的<br>结合 <sup>(e)</sup><br>(%) |
|--------------------|---------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 鹅脱氧胆酸<br>(CDCA)    | 32                        | 3.2                                                  | 45.5                                        | 2.2                              | 93                               |
| 熊脱氧胆酸<br>(UDCA)    | 7.5                       | 6.0                                                  | 50.5                                        | 2.2                              | 94                               |
| 胆汁酸(CA)            | 273*                      | 11*                                                  | -                                           | 1.1*                             | 50*                              |
| 牛磺鹅脱氧胆酸<br>(TCDCA) | 高度可溶                      | 3.0*                                                 | -                                           | 0.9*                             | 70*                              |
| 牛磺熊脱氧胆酸<br>(TUDCA) | 高度可溶                      | 2.2*                                                 | -                                           | 1.1*                             | 67*                              |
| 6MUDCA             | 28*                       | 4.2*                                                 |                                             | 1.3*                             | 80*                              |
| 10                 | 120                       | 5.9                                                  | 52.4                                        | 1.6                              | 83                               |

[0244] <sup>a</sup>Ws:水溶性,将胆汁酸(BA)作为质子化的种类并且因此对于牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)以及牛磺熊脱氧胆酸(TUDCA)而言不进行评价,因为上述两种是高度可溶性的(hs)。

[0245] <sup>b</sup>CMC:在0.15M的氯化钠水溶液中测定的临界胶束浓度

[0246] <sup>c</sup>ST<sub>CMC</sub>:在0.15M的氯化钠水溶液中,在临界胶束浓度下的表面张力

[0247] <sup>d</sup>LogP<sub>A</sub>:所研究的胆汁酸作为离子化物种所具有的1-辛醇-水分配系数

[0248] \*:来自于文献的数值

[0249] 临界胶束浓度(CMC)

[0250] 对所有的带电荷的分子进行清洁能力的评价,其中所述的清洁能力即形成胶束的趋向性,所述的带电荷的分子是作为钠盐溶解于水中的(在pKa之上2个单位)。通过对表面

张力(ST)的测量来确定所述的临界胶束浓度(CMC),其中使用到了气泡最大压力法,所述的气泡最大压力法能够给出表面张力的数值,所述的数值受到了与静态方法相类似的潜在杂质所产生的轻微的影响。所述的张力计为Sensadyne 6000(Chem-Dyne研究公司,密尔沃基,威斯康星州),所述的张力计上装配有两个直径为0.5毫米以及4.0毫米的玻璃探针,其中所述的玻璃探针与一个氮气源进行了连接。所述的气泡频率是26℃下(P=2.7atm)蒸馏水中1个气泡/秒并且利用经过双重蒸馏的水以及甲醇来进行所述的校准。在各种不同的浓度下,对存在于0.15M的氯化钠之中的胆汁酸(BA)的钠盐溶液所具有的表面张力进行测量,其中所述的浓度在0.10毫摩-50毫摩的范围之内。根据所述的胆汁酸浓度的对数对所述的表面张力数值进行绘图;使用最小平方的方法对相对应于所述曲线的两个部分(单体相以及胶束相)的回归线进行计算,并且取所述回归线的交集作为所述的临界胶束浓度(CMC)数值。通过所述的表面张力(ST)与浓度的曲线,同样可以对处于所述的临界胶束浓度(CMC)(存在于单体种类与多聚体种类之间的平衡)下的表面张力的数值进行计算,所述的表面张力的数值给出了与所述的清洁能力有关的信息,所述的清洁能力与所述的胶束所具有的尺寸以及相关的表面张力降低能力有关。

[0251] 在非平衡环境下通过表面张力测量值对所述的临界胶束浓度(CMC)进行评价,其中所述的非平衡环境即,杂质能够轻微的对所述的表面张力的结果产生影响的环境(附图6)。表格2表示出了所述的结果。化合物10呈现出一种具有低的表面张力降低活性的高的临界胶束浓度(CMC),这意味着这种化合物是一种温和的清洁剂并且所述的胶束具有非常低的聚合数量。在所述的C-16 $\beta$ 位置上一个羟基基团的存在减小了所述的疏水性面积,其中所述的疏水性面积是造成背对背相互作用的原因,上述的相互作用形成胶束并且因此,所述的胶束是小的并且是具有差的清洁能力的。当积累在一种给定的生物学流体或者器官之中时,这种性质给予了所述分子一种低的毒性。

[0252] 辛醇/水分配系数

[0253] 当分子以其离子化的形式存在时对其所具有的辛醇/水分配系数进行测量,并且因此在一个相对高的pH(8至9)下对所述的羧酸类似物进行研究,用以确保所述的羧基基团的完全离子化。使用常规的摇瓶培养的方式对所述的1-辛醇/水分配系数(log P)进行评价。所述的试验是在0.1毫摩的胆汁酸溶液中进行的,其中利用0.1M的磷酸盐缓冲液对所述的胆汁酸溶液进行了缓冲使之pH为8,用以确保所述的胆汁酸(BA)发生完全的离子化;所述的log P值涉及的是以离子形式存在的所述的胆汁酸(BA),而不是所述的质子化种类,并且每一种胆汁酸(BA)所具有的初始浓度低于其本身的临界胶束浓度(CMC)数值。利用1-辛醇对所述的水性缓冲液进行先前的预先饱和,在此之后向其中加入利用水进行预先饱和的5毫升的1-辛醇并且使所述的样本进行2周的平衡,其中所述的平衡是发生在室温下的连续搅拌条件之下的。经过离心之后,小心的将所述的两相进行分离。利用高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)对存在于所述的水相之中的胆汁酸(BA)的浓度进行测量,其中使用了C18柱(150毫米x 2毫米内径,4微米),并且利用水作为流动相,其中在所述的水中含有pH为5的15毫摩的乙酸以及乙腈。所述的流动速率为150微升/分钟并且将所述的柱保持在45℃。在所述的多重反应监测模式下实现所述的质谱测量捕获,其中使用了在负性电离中的所述的电喷雾电离(ESI)源。

[0254] 表格2表示出了所述的结果。相比较于所述的天然的、类似的胆汁酸(CA)而言,在3

$\alpha$ 、7 $\alpha$ 以及16 $\beta$ 位置上具有三个羟基基团的所述的羧酸化的化合物10表现出了稍高的亲脂活性,这归因于存在于C-6位置上的乙基。考虑到所述的12- $\alpha$ 位置似乎不会对清洁能力这一性质产生主要的作用,这种差异可能归因于所述的16- $\beta$ 羟基基团所处于的不寻常的位置。

[0255] 白蛋白的结合

[0256] 在一个固定的胆汁酸(BA)-白蛋白比例条件下,通过平衡透析对所述的白蛋白结合所具有的程度进行了评价。将每一种胆汁酸(BA)以100微摩的浓度溶解于5%的牛血清白蛋白-生理盐水溶液(pH7.2)中并且将其于25℃下放置24小时。以25毫升的胜利盐水溶液为背景,在纤维素囊内对两毫升的这种溶液进行透析,其中所述的纤维素囊具有12000-14000道尔顿的分子量截留。在25℃下,通过轻柔的振荡对所述的系统进行72小时的平衡。在与先前的分析所相同的条件下,利用高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)对存在于所述的透析溶液(对应于所述的游离的未结合的部分)以及所述的起始溶液中的胆汁酸(BA)浓度进行测定。

[0257] 通过所述的初始胆汁酸(BA)浓度以及通过存在于所述的透析馏分中的未结合的浓度对所述的白蛋白结合的百分数进行计算。数据记录在所述的表格2中。

[0258] 由于存在于所述的侧链之上的甲基基团,所述的化合物10所具有的结合百分比高于胆汁酸(CA)。与天然存在的胆汁酸(BA)相类似,化合物10所表现出的一种白蛋白的结合与一种相对快速的肝吸收相协调。

[0259] 实施例5:在人类粪便培养物中的体外代谢稳定性

[0260] 对肠内细菌的稳定性

[0261] 7 $\alpha$ -脱羟基化作用

[0262] 将经过均质的新鲜的人类粪便(500毫克)转移到无菌试管中并且向其中加入5毫升灭菌的剁碎的肉-葡萄糖培养基(Scott实验室,Fiskville,RI)。在此之后以0.05毫摩的最终浓度向其中添加胆汁酸(BA)。在37℃下对试管进行培养;在此之后,在进行了所述的胆汁酸(BA)添加的0小时,1小时,2小时,4小时,8小时以及24小时之后,利用150微升30%的氢氧化钾终止所述的反应。使所述的样本在3500rpm下离心10分钟;通过C-18固相分离的方法从所述的上清液中分离所述的胆汁酸(BA)并且通过薄层层析法(TLC)以及高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)对其进行分析。

[0263] 薄层层析法,利用0.25毫米厚度的硅胶板(Merck,Darmstadt,德国),被用来作为所述的第一个筛选测试来进行。被用来对所述的发生共轭的胆汁酸(BA)进行分离的所述的溶剂系统是由丙酸/乙酸异戊酯/水/正丙醇(3:4:1:2,体积/体积/体积/体积,溶剂I)所组成的,而被用来对所述的未发生共轭的胆汁酸(BA)进行分离的所述的溶剂系统是乙酸/四氯化碳/异丙酸乙酯/乙酸异戊酯/水/正丙醇/苯(1:4:6:8:2:2,体积/体积/体积/体积/体积/体积,溶剂II)。利用5%的磷钼酸的乙醇溶液对被分离的胆汁酸(BA)进行显影。

[0264] 当在人类粪便培养物中进行培养时,化合物10是非常稳定的,即使经过24小时之后,会有超过85%的未发生变化的所述化合物被回收。与之相反的是,所述的对照,天然类似物鹅脱氧胆酸(CDCA)表现出几乎一小时的半衰期并且在经过8小时的培养之后所述的鹅脱氧胆酸(CDCA)几乎完全产生代谢变化(7-脱羟基化)从而形成石胆酸。同样的,经过长时间的培养之后,所述的7脱羟基化作用以及一种7氧代衍生物的中间产物的形成几乎被废止了。

[0265] 侧链的稳定性

[0266] 根据所述的第一个结果,所述的肠内细菌的酶的活动没有对所述的侧链进行修饰。这些数据表明,在所述的C-位置上,所述的乙基基团的存在能够保护所述的7-羟基基团免于被氧化或者被除去,其中所述的保护作用是通过位阻现象来实现的。除此之外,化合物10对于侧链的代谢作用而言同样是非常稳定的。

[0267] 实施例6:经过十二指肠(id)施用以及股动脉(iv)施用之后,化合物10在胆汁瘘管大鼠体内的胆汁分泌以及代谢

[0268] 目标以及基本原理

[0269] 所述的新的胆汁酸(BA)类似物所具有的结构上的修饰能够对它们的肝吸收、肝运输以及分泌和肠道吸收产生影响。因此,在经过静脉内(iv)施用或者十二指肠(id)施用之后,对于所述的胆汁分泌以及它们的代谢作用所具有的认识成为在备选物的选择中的一个关键点,其中所述的备选物用于进行另外的研究。

[0270] 为了对所述的肠内吸收所具有的模式以及效率进行评价,以相同的剂量同时通过静脉内(股动脉输液)的方式以及口服(十二指肠输液)的方式对化合物10进行施用,并且在胆汁瘘管大鼠模型中对其胆汁的分泌速率进行评价。同样对在胆汁的生成方面所具有的利胆剂作用进行评价。存在于静脉内(iv)施用与十二指肠(id)施用之间的曲线下面积(AUC)所具有的差异说明了它的肠内吸收并且给出了与它的生物可利用率有关的信息,其中所述的曲线指的是所述的胆汁分泌vs时间的曲线。而且,所述的肝的代谢作用与肠的代谢作用同样可以是非常不同的并且因此对化合物10所具有的胆汁分泌以及它的主要(肠内)代谢物和肝脏代谢物进行测定。

[0271] 利胆剂作用

[0272] -十二指肠输液

[0273] 所述的胆汁瘘管大鼠模型是在博洛尼亚(Bologna)大学的试验室设施内建立的。将所述的化合物以1微摩/千克/分钟(1小时的输液)的剂量经由十二指肠输液(id)的方式向大鼠组进行施用。所述的大鼠带有一个胆汁瘘管,用以在进行所述的输液之前以及输液的过程中在不同的时间处收集胆汁样本。为了进行十二指肠输液的试验,对6只大鼠(250±10克)进行了处理。每15分钟收集胆汁样本并进行4个小时的收集。除此之外,在相同的时间条件下利用生理盐水溶液对3只对照大鼠进行处理并且对其进行取样(十二指肠对照大鼠)。

[0274] 附图7表示的是在样本的收集过程中胆汁的流动(一只动物)。经过30分钟的基线胆汁收集之后开始十二指肠的输液并且将其持续一个小时。化合物10不属于利胆剂并且所述的胆汁的流动与对照组相类似。

[0275] -静脉内输液

[0276] 为了进行股动脉的输液试验,以1微摩/分钟/千克的剂量利用化合物10对6只大鼠(体重,250±10克)进行了处理。附图8表示的是在所述的研究过程中胆汁的流动。经过了75分钟的稳定状态之后开始进行股动脉的输液并且将其持续60分钟。每15分钟收集胆汁样本并进行4个小时的收集。除此之外,在相同的时间条件下利用生理盐水溶液对3只对照大鼠进行处理并且对其进行取样(股动脉对照大鼠)。

[0277] 在整个的试验阶段内,在静脉内(iv)输液的过程中所述的胆汁流动维持在一个存

在于40至80微升/分钟/千克范围内的数值上,其中所述的静脉内(iv)输液利用的是3%的牛血清白蛋白(BSA)生理盐水溶媒(对照,n=1)。附图8报道的是经过鹅脱氧胆酸(CDCA)的静脉内(iv)输液之后所述的胆汁流动,其中所述的鹅脱氧胆酸(CDCA)是作为所述的对照化合物。与所述的对照试验相比,没有观察到显著的差异并且所述的最大流动速率仅仅比所述的对照情况具有些许的升高(80微升/分钟/千克比70微升/分钟/千克)。

[0278] 所施用的类似物所具有的胆汁分泌

[0279] 对在所述的静脉内(iv)试验以及十二指肠(id)试验中所收集到胆汁样本进行分析,用于确定所施用的类似物所具有的胆汁分泌以及它们的代谢产物。进行高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)分析。实验室获得每一种化合物的纯化的晶体粉末。制备以1毫摩/升的浓度(化合物10除外,它的浓度为350微摩/升)存在于甲醇中的储备溶液并且通过将所述的最初溶液稀释适当的体积的方式制备工作溶液。甲醇以及乙腈具有高效液相色谱(HPLC)级别的纯度。氨水为30%并且乙酸为99.8%。所有的试剂是从Carlo Erba Reagents处获得的。通过Milli-Q系统制备高效液相色谱(HPLC)级别的水。

[0280] 样本的制备

[0281] 使大鼠的胆汁样本回复到室温,简单搅拌,并且利用15毫摩的70:30(体积/体积)的乙酸铵缓冲液(pH为5.0):乙腈对其进行稀释,其中所述的稀释是以1:100体积/体积(来自于十二指肠输液的胆汁样本)以及1:100或者1:200体积/体积(来自于股动脉输液的样本)的比例来进行的。将最后的溶液转移到自动取样试器的试管内,并且向所述的色谱柱内注射10微升。

[0282] 高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)方法

[0283] 在负离子化模式下使用电喷雾电离(ESI)源通过高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)对大鼠的胆汁样本进行分析。为了进行液相色谱法,使用到一种Waters Alliance 2695分离模块,其中所述的分离模块与自动取样器进行了偶联。将自动取样器保持在7℃下。利用Synergi Hydro-RP C<sub>18</sub>柱(150x 2.0毫米内径,4微米的颗粒尺寸)来实施分离,利用SecurityGuard ODS 4x 2.0毫米内径的预柱来进行保护,上述两个柱子均是由Phenomenex来提供的。对被分析物进行洗脱,其中所述的洗脱使用了15毫摩的乙酸铵缓冲液(pH为5.00)作为流动相A以及乙腈作为流动相B。使流动相B在10分钟的时间内由30%增加到40%,在此之后在10分钟的时间内增加到100%,并且保持恒定10分钟。流动速率为150微升/分钟并且将所述的柱维持在45℃下。将所述的柱流出物导入到电喷雾电离(ESI)源内,其中所述的电喷雾电离(ESI)源与一个三重四级杆质谱仪(Quattro-LC, Micromass)进行了连接,所述的三重四级杆质谱仪是以多重反应监测(MRM)获取模式来运转的。氮气被用来以90升/小时的流动速率作为喷雾器气体,并且以930升/小时的流动速率被用来作为去溶剂化气体。分别将离子源阻滞温度以及去溶剂化温度设定为80℃以及180℃。毛细管电压为3.0千伏(kV)。

[0284] 4.0版本的MassLynx软件被用来进行数据的获取以及处理。除此之外,在单一质谱(MS)配置的试验中或者串联质谱(MS/MS)配置的试验中均使用了质谱法,用以对代谢产物进行识别。

[0285] 量化

[0286] 每天制备一个五点的校准曲线并且以两倍的方式进行注射。在流动相中以0.1至

25微摩/升的浓度范围制备获得校准样本。从所述的被分析物峰面积vs被分析物浓度的绘图中获得线性校准曲线参数,其中使用到了最小平方回归分析(重量=1/x<sup>2</sup>)。相关系数为 $\geq 0.989$ 。

[0287] 所施用的类似物所具有的药物动力学(胆汁的分泌):静脉内(iv)与十二指肠(id)的比较

[0288] 所述的数据涉及的是:以1微摩/千克/分钟的剂量对所述的类似物进行十二指肠输液以及股动脉输液之后,在胆汁中回收到的所述类似物的分泌速率。主要代谢产物以及次要代谢产物将在稍后进行报道。

[0289] 表格3表示的是化合物10所具有的浓度数值以及分泌量数值,其中所述的化合物10是从大鼠的胆汁样本中获得的,所述的胆汁样本是在所述的十二指肠输液(1小时,从75分钟至135分钟)的过程中收集到的。

[0290] 表格3.

[0291]

| 时间<br>(分钟) | 浓度<br>(毫摩/升) | 分泌量<br>(微摩/千克/分钟) |
|------------|--------------|-------------------|
| 90         | 0.01         | 0.0004            |
| 120        | 0.07         | 0.003             |
| 150        | 0.39         | 0.019             |
| 180        | 0.14         | 0.003             |
| 210        | 0.09         | 0.004             |
| 240        | 0.03         | 0.001             |
| 270        | 0.02         | 0.001             |
| 300        | 0.02         | 0.001             |

[0292] 表格4表示的是化合物10所具有的浓度数值以及分泌量数值,其中所述的化合物10是从大鼠的胆汁样本中获得的,所述的胆汁样本是在所述的股动脉输液(1小时,从75分钟至135分钟)的过程中收集到的。

[0293] 表格4.

[0294]

| 时间<br>(分钟) | 浓度<br>(毫摩/升)      | 分泌量<br>(微摩/千克/分钟) |
|------------|-------------------|-------------------|
| 75         | 0.04              | 0.002             |
| 90         | 2.3               | 0.127             |
| 120        | 0.90              | 0.065             |
| 150        | 0.06              | 0.004             |
| 180        | 0.04              | 0.003             |
| 210        | 0.02              | 0.001             |
| 240        | n.d. <sup>b</sup> | - <sup>a</sup>    |

[0295] <sup>a</sup>-:未进行计算 <sup>b</sup>n.d.:未检测

[0296] 经过静脉内(iv)输液之后,所述的化合物10所具有的胆汁分泌并不是有效的并且

所述的最大分泌速率是低的(附图9)。所述的化合物发生了代谢变化从而形成了所述的牛磺酸共轭物并且这导致了其回收率的轻微的提高。经过十二指肠(id)施用之后,所述的胆汁的分泌比所述的静脉内(iv)试验的结果低的多,这表明了所述分子所具有的差的肠内吸收。

[0297] 肝的代谢作用

[0298] 化合物10经受了一种与天然存在的胆汁酸(BA)相似的肝的代谢作用。经过静脉内(iv)的施用之后,化合物10在胆汁中分泌出来并且主要与牛磺酸发生了共轭。同样发现了次要代谢产物,其中所述的次要代谢产物例如是内酯以及一种单葡萄糖苷酸代谢产物。经过十二指肠(id)施用之后,所述的分子本身被得以回收并且主要通过代谢作用形成了所述的牛磺酸共轭物。附图10a:在所述的静脉内(iv)试验中,使用质谱法在胆汁中识别出的化合物10及其主要的代谢产物。数据被报道为绝对面积值。

[0299] 附图10b:附图10a的电子放大显示图。

[0300] 附图10c:在所述的十二指肠(id)试验中,使用质谱法在胆汁中识别出的化合物10及其主要的代谢产物。数据被报道为绝对面积值。

[0301] 化合物10具有适度的亲水性并且具有低的清洁能力。所述的肝吸收是有效的并且所述的肠内吸收也是如此。所述的化合物本身在胆汁中进行分泌并且主要以牛磺酸共轭物的形式存在并且基本上完成了在胆汁内的所述的回收。

[0302] 实施例7:在肝细胞HepG2细胞上的体外毒性

[0303] 使用肝细胞HepG2细胞检测对本发明中所述的化合物所具有的体外毒性进行评价。通过监测三磷酸腺苷(ATP)的减少的方式对于细胞HepG2细胞的细胞毒性进行测定,并且通过监测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)的活化作用的方式对于细胞HepG2细胞的细胞凋亡进行测定。所述的结果在表格5中被表示出来。

[0304] 细胞毒性

[0305] 使用PerkinElmer三磷酸腺苷(ATP)-Lite 1 STEP对细胞的存活能力进行测量。三磷酸腺苷(ATP)是一种用于细胞存活能力的标记物,因为它存在于所有的代谢活性细胞之中并且当所述的细胞经受到细胞坏死或者细胞凋亡时所述的三磷酸腺苷(ATP)所具有浓度发生快速的下降。将人类NCI-H716细胞或者肝细胞(HepG2)细胞( $1 \times 10^4$ )接种于96孔培养板内并且在37℃下利用10倍的所述化合物10的稀释液对其进行4小时的刺激,其中所述的化合物10从1纳摩至300微摩。在室温下对所述的培养板进行10分钟的平衡并且向含有细胞的100微升的培养基中添加100微升的三磷酸腺苷(ATP)-Lite 1 STEP试剂。利用Victor Light(PerkinElmer)对发光情况进行读取。从背景中减去所述的试验信号。他莫昔芬被用来作为细胞毒性的阳性对照,而未经处理的细胞被用来作为阴性对照。

[0306] 细胞凋亡

[0307] 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)参与了对细胞凋亡作用的分子调节并且TruPoint含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)底物能够进行灵敏的、强劲的以及均一的时间分辨荧光检测,其中所述的时间分辨荧光检测是针对含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)所具有的活性所进行的检测。

[0308] 将人类肝细胞(HepG2)接种于( $1 \times 10^4$ )含有人类肝细胞(HepG2)的培养基中,在所述的培养基中不含有丙酮酸钠。在37℃下利用受试化合物的连续稀释液对所述的细胞进行

刺激,其中所述的受试化合物具有1纳摩至300微摩的浓度,并且所述的刺激是以一式三份的方式来完成的。星形孢菌素被用来作为凋亡细胞的阳性对照。阴性对照为:1.未经过刺激的细胞;2.不含有细胞的单独的培养基;3.在不存在所述的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)底物的条件下所培养的细胞。向所述的细胞中加入细胞溶解缓冲液以及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)底物并且在1小时之后以及24小时之后,利用En Vision对荧光性进行测量。

[0309] 细胞坏死

[0310] 通过对从所述的坏死细胞中释放出的乳酸脱氢酶(LDH)进行测量的方式对所述的细胞坏死进行分析,其中所述的测量使用的是Promega's CytoTox ONE均质膜完整性检测的方式。将人类肝细胞( $1 \times 10^4$ )接种于96孔培养板内。经过18小时的培养之后,利用不含有丙酮酸钠以及不含有血清的新鲜培养基进行替换并且向其中加入化合物10,所述的化合物10是以0.1微摩至500微摩的剂量应答量进行添加的。Triton 1%被用来作为最大乳酸脱氢酶(LDH)释放对照。他莫昔芬被用来作为细胞坏死诱导剂。将上述被接种的细胞再次接种回所述的培养器内再进行4小时的培养。将所述的上清液转移至一个新的培养板内并且向所述的培养板内添加相同体积的所述的Cyto Tox-ONE试剂。经过1小时的培养之后,利用EnVision多标签培养板读数器对所述的荧光性进行读取,其中所述的多标签培养板读数器具有560纳米的激发波长以及590纳米的发射波长。

[0311] 表格5.在人类肝细胞上的体外毒性

[0312]

| 化合物             | 细胞毒性<br>三磷酸腺苷的减少<br>EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | 细胞凋亡<br>含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3的活化<br>EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | 细胞坏死<br>乳酸脱氢酶的释放<br>EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
|-----------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 星形孢菌素<br>(细胞凋亡) | 15                                              | 3                                                           | n.d.                                            |
| 他莫昔芬<br>(细胞坏死)  | 47                                              | 4                                                           | 35                                              |
| 石胆酸             | 84                                              | 65                                                          | 105                                             |
| 鹅脱氧胆酸           | 650                                             | 890                                                         | >1000                                           |
| 熊脱氧胆酸           | >1000                                           | n.d.                                                        | n.d.                                            |
| 胆汁酸             | >1000                                           | n.d.                                                        | n.d.                                            |
|                 | >1000                                           | n.d.                                                        | n.d.                                            |

[0313] n.d.:未检测

[0314] 实施例8:核受体(NR)的选择性检测

[0315] 使用本领域已知的检测方法对本发明中所述的化合物所具有的选择性进行检测。具体的,使用到了下述的检测方法:

[0316] 法尼酯X受体(FXR)以及肝脏X受体(LXR):辅助活化剂的补充( $\alpha$ 筛选);

[0317] G蛋白偶联受体5(TGR5):存在于人类肠内细胞系(NCI-H716)上的环化腺核苷一磷酸(cAMP)水平;

[0318] 孕烷X受体(PXR):配体竞争性检测(结合检测)

[0319] CAR:辅助活化剂的补充(Lanthascreen)

[0320] 表格6表示的是上述这些检测所得到的结果。

[0321] 时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)辅助活化剂检测

[0322] Lanthascreen(Invitrogen)被用来进行核受体的选择性检测。所述的试剂盒中使用一种铽标记的抗谷胱甘肽转移酶(GST)抗体,一种荧光素标记的辅助活化剂肽,以及一个核受体(NR)配体结合结构域,其中所述的核受体(NR)配体结合结构域具有谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签,上述三种物质是以均一混合以及均一读数的检测形式存在的。所述的检测是在384个微孔的培养板(PerkinElmer)内进行的。由Invitrogen提供了一种20微升的总的检测反应液,其中包括5纳摩的带有谷胱甘肽转移酶(GST)标签的核受体(NR),125纳摩的辅助调节因子肽,5纳摩的带有铽-抗谷胱甘肽转移酶(GST)的抗体(带有铽-抗-谷胱甘肽转移酶标签的),5毫摩的二硫苏糖醇(DTT)以及存在于所述的检测缓冲液之中的各种不同浓度的化合物10。所述的阴性对照中不含有所述的化合物10但是含有在所述的激动剂孔中所含有的其他中的每一种。经过在黑暗下进行的1小时的培养之后,在所述的Envision中进行时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)的测量。按照各种不同的配体浓度对所述的发射比例520/495进行绘图。使用GraphPad Prism对所述的数据进行分析从而得到EC<sub>50</sub>值,其中使用到了S曲线方程式,所述的S曲线方程式具有可变的斜率。

[0323]

表格六

核受体选择性检测

| 化合物<br>(对照标准) | 法尼酯X受体的<br>活化<br>(CDCA=10-20μM)<br>EC <sub>50</sub> (μM) | G蛋白偶联受体<br>S的活化<br>(LCA=4-8μM)<br>EC <sub>50</sub> (μM) | 肝脏X受体α的活<br>化<br>(TGR5=0.08μM)<br>EC <sub>50</sub> (μM) | 孕烷X受体的结合<br>(SR-12183-0.015μM)<br>EC <sub>50</sub> (μM) | 辅助活化剂补充<br>的活化<br>(CITCO=0.005μM)<br>EC <sub>50</sub> (μM) | 过氧化物酶体增殖<br>物活化受体δ的活<br>化<br>(GW0742=0.003μM)<br>EC <sub>50</sub> (μM) | 维他命D受体的<br>活化<br>(二氢维生素<br>D3=0.005μM)<br>EC <sub>50</sub> (μM) |
|---------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 鹅脱氧胆酸         | 20                                                       | 30                                                      | 无活性                                                     | >250                                                    | >250*                                                      | 无活性                                                                    | 无活性                                                             |
| 石胆酸           | 无活性                                                      | 4-8                                                     | 无活性                                                     | 23                                                      | 无活性                                                        | 无活性                                                                    | 无活性                                                             |
| 胆汁酸           | 无活性                                                      | 30                                                      | 无活性                                                     | 无活性                                                     | 无活性                                                        | 无活性                                                                    | 无活性                                                             |
| 熊脱氧胆酸         | >150                                                     | 无活性                                                     | 无活性                                                     | >250                                                    | >250*                                                      | 无活性                                                                    | 无活性                                                             |
| 化合物 10        | 12                                                       | 0.6                                                     | 无活性                                                     | 64                                                      | 无活性                                                        | 无活性                                                                    | 无活性                                                             |

检测方法

法尼酯X受体 (FXR) 以及肝脏X受体 (LXR): 辅助活化剂的补充 (α筛选);  
G蛋白偶联受体 5 (TGR5): 存在于人类肠内细胞系 (NCL-H716) 上的环化腺核苷一磷酸 (cAMP) 水平;  
孕烷X受体 (PXR): 配体竞争性检测 (结合检测)  
\*:数据代表逆激动作用

[0324] 其他实施方式

[0325] 尽管本发明通过它的详述内容被进行了描述,前述的说明意在进行阐述并且不会

对发明所具有的范围产生限制,所述的范围是由后附的权利要求所具有的范围来定义的。其他的方面,优点,以及修饰存在于下述的权利要求的范围之内。本领域技术人员将能够理解的是,可以对其进行形式以及细节上的各种改变,这种改变不会背离由后附的权利要求所涵盖的本发明的范围的。

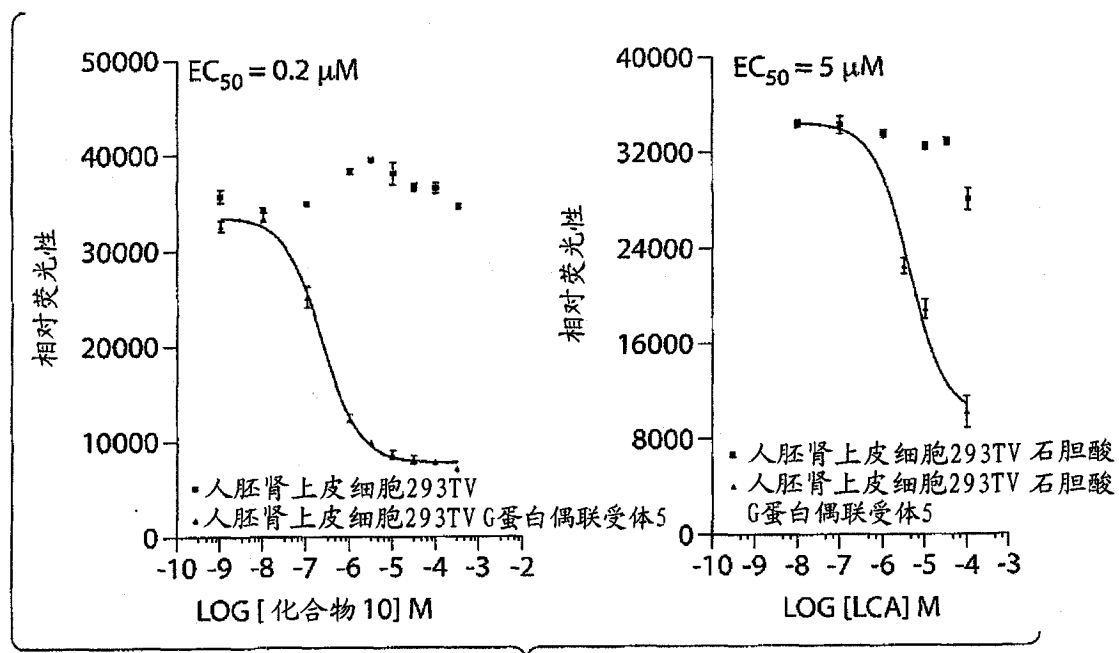


图1

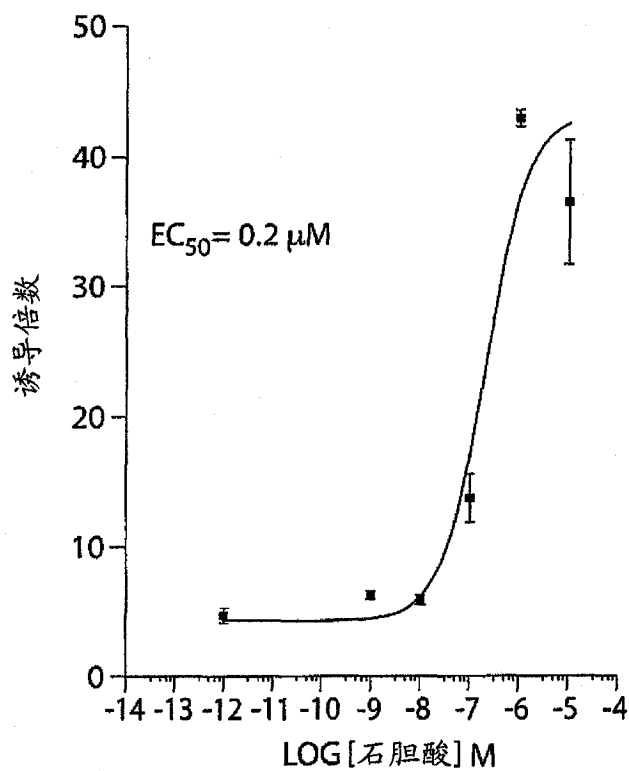


图2A

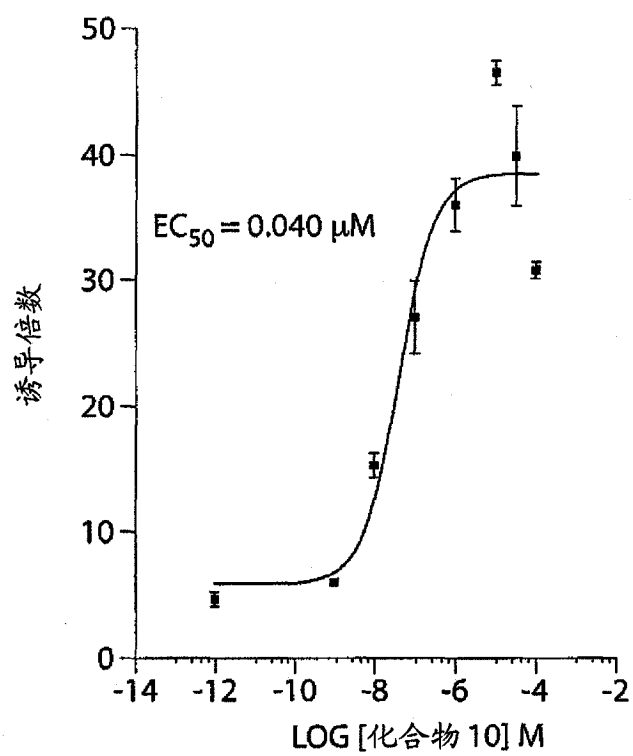


图2B

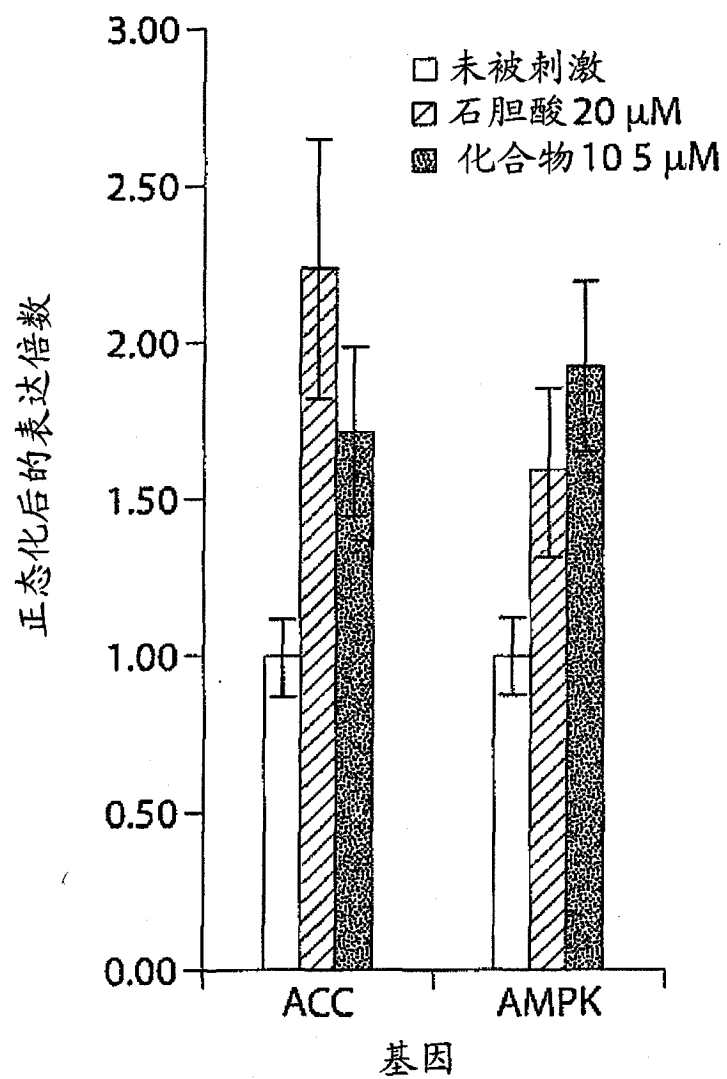


图3

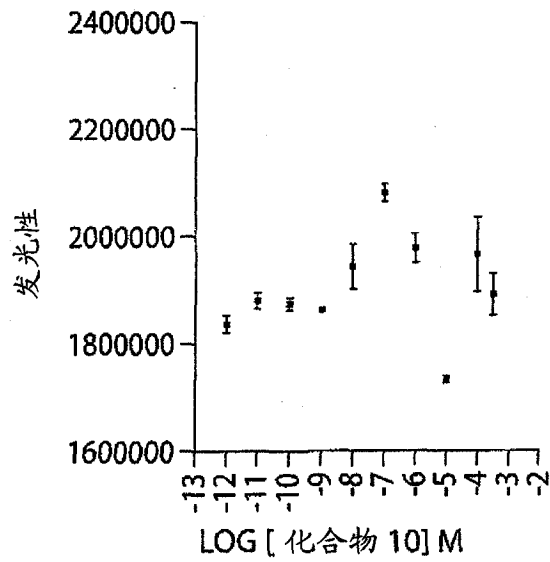


图4A

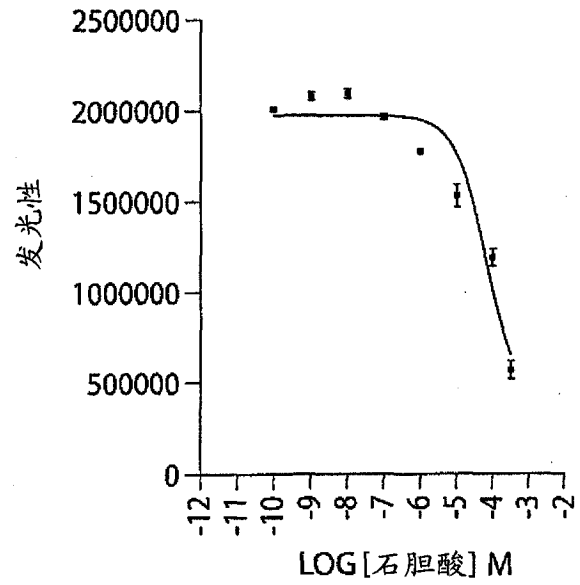


图4B

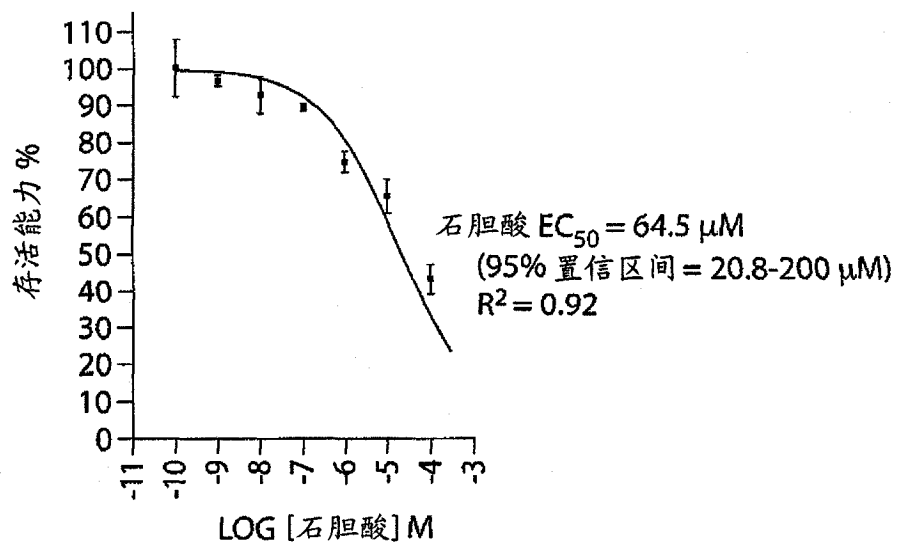


图4C

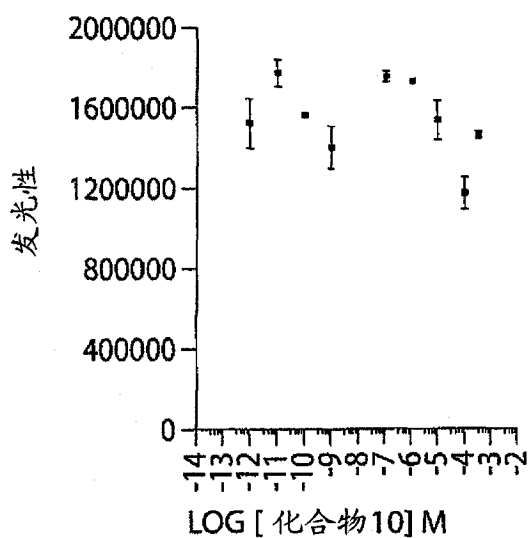


图5A

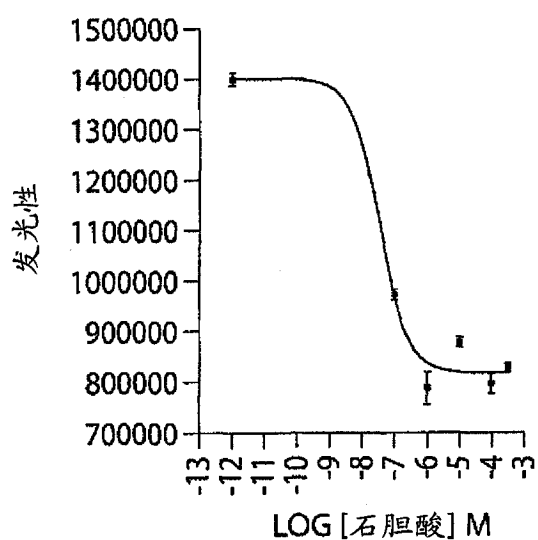


图5B

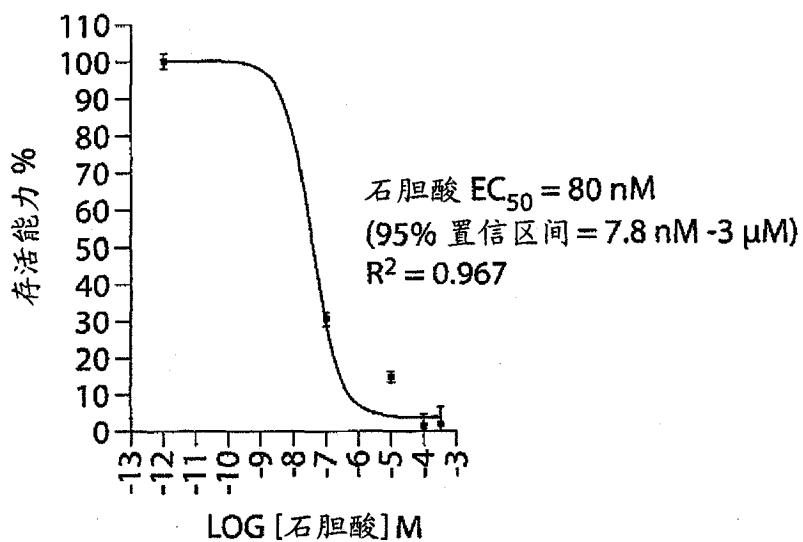


图5C

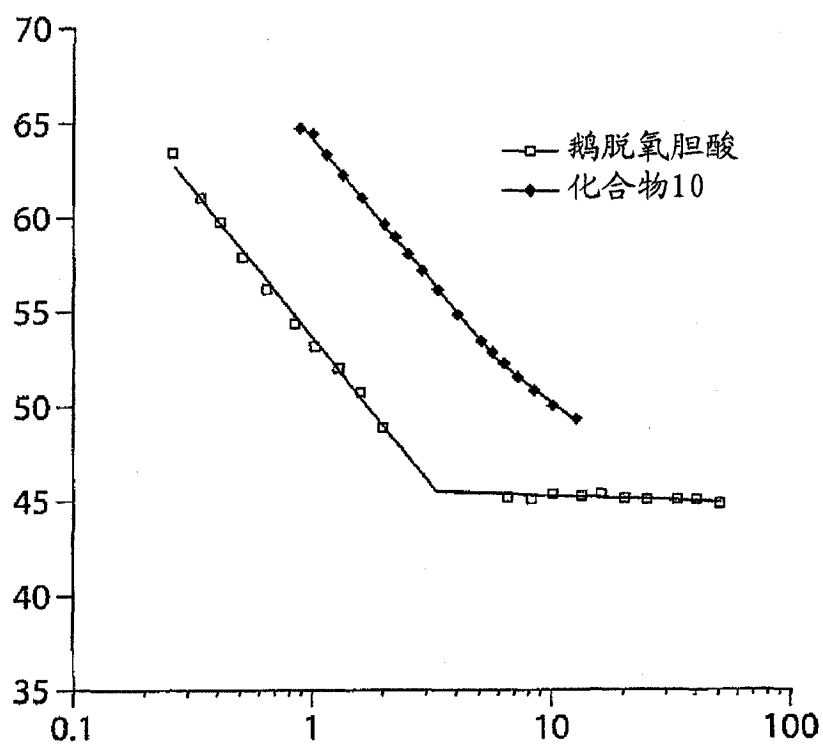


图6

10

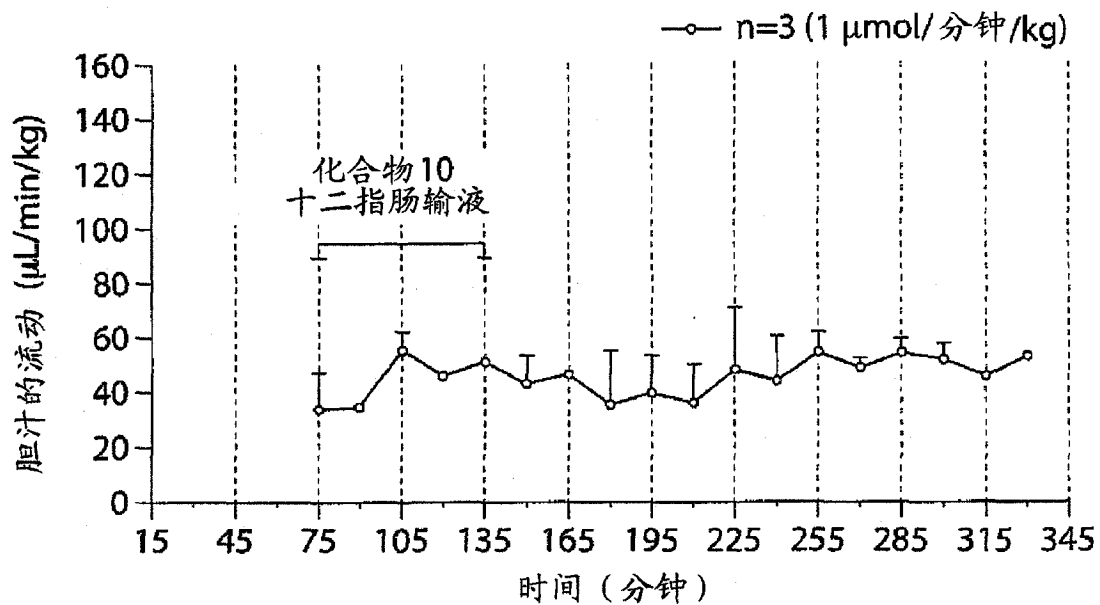


图7

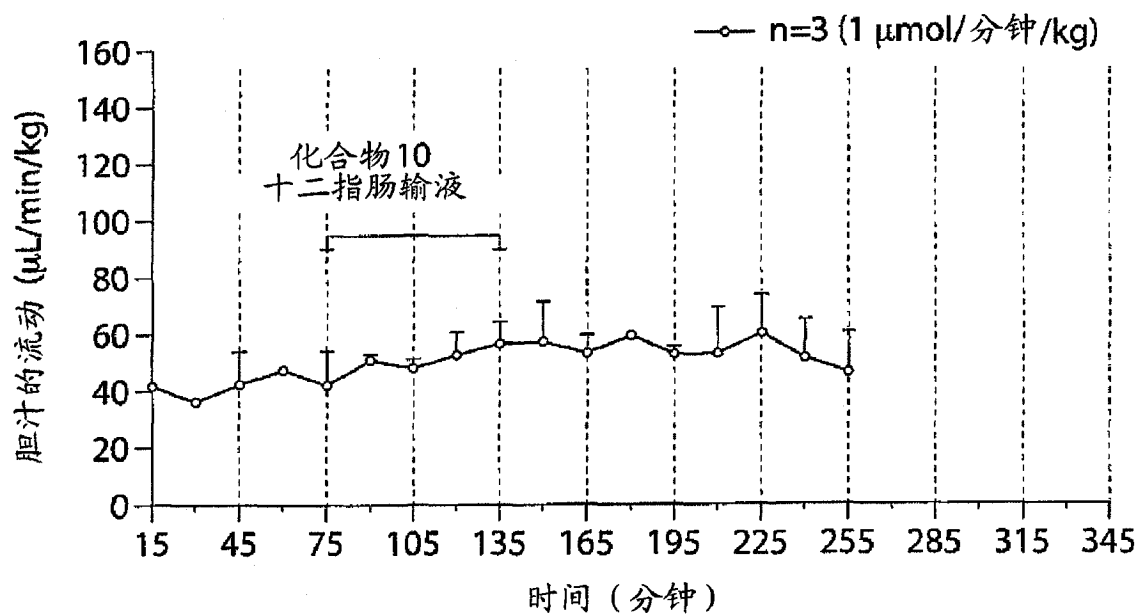


图8

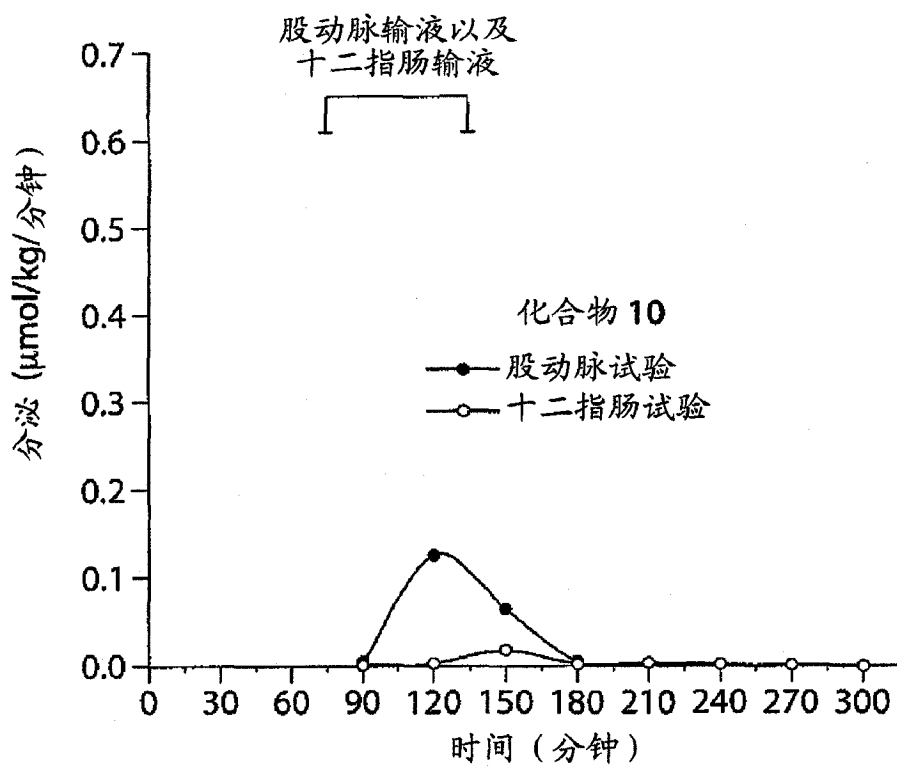


图9

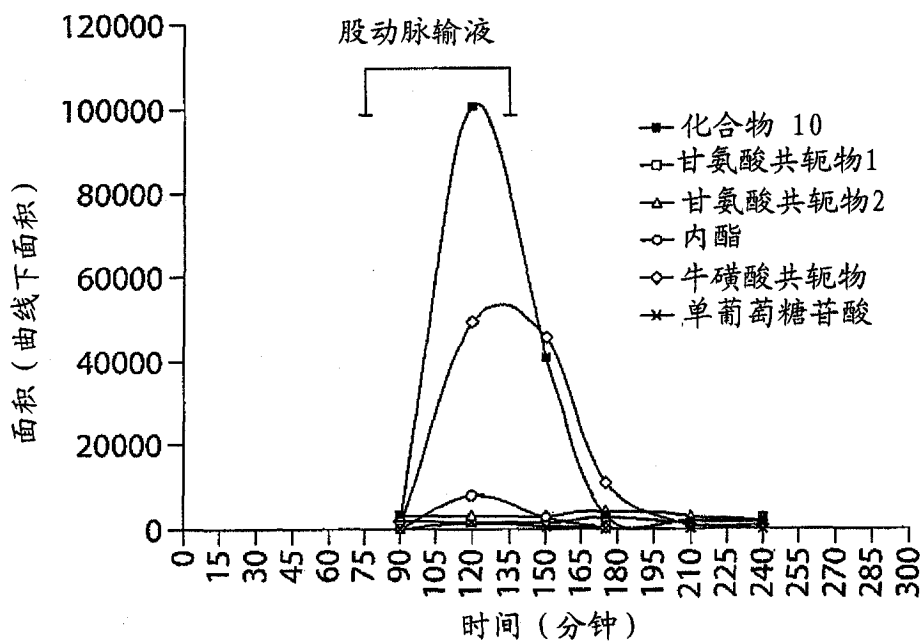


图10A

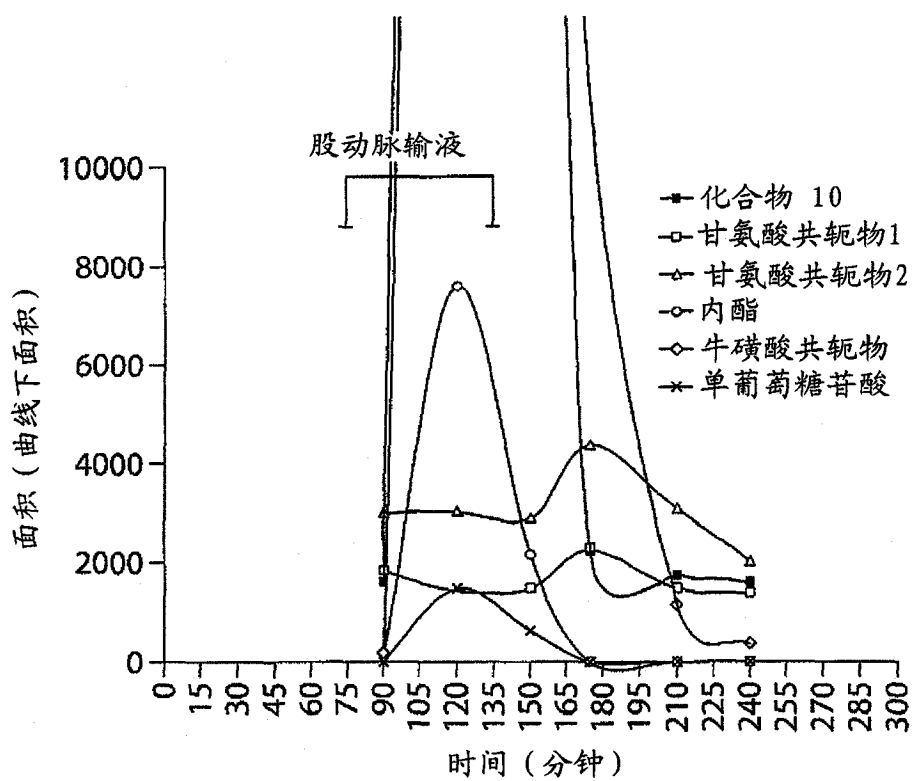


图10B

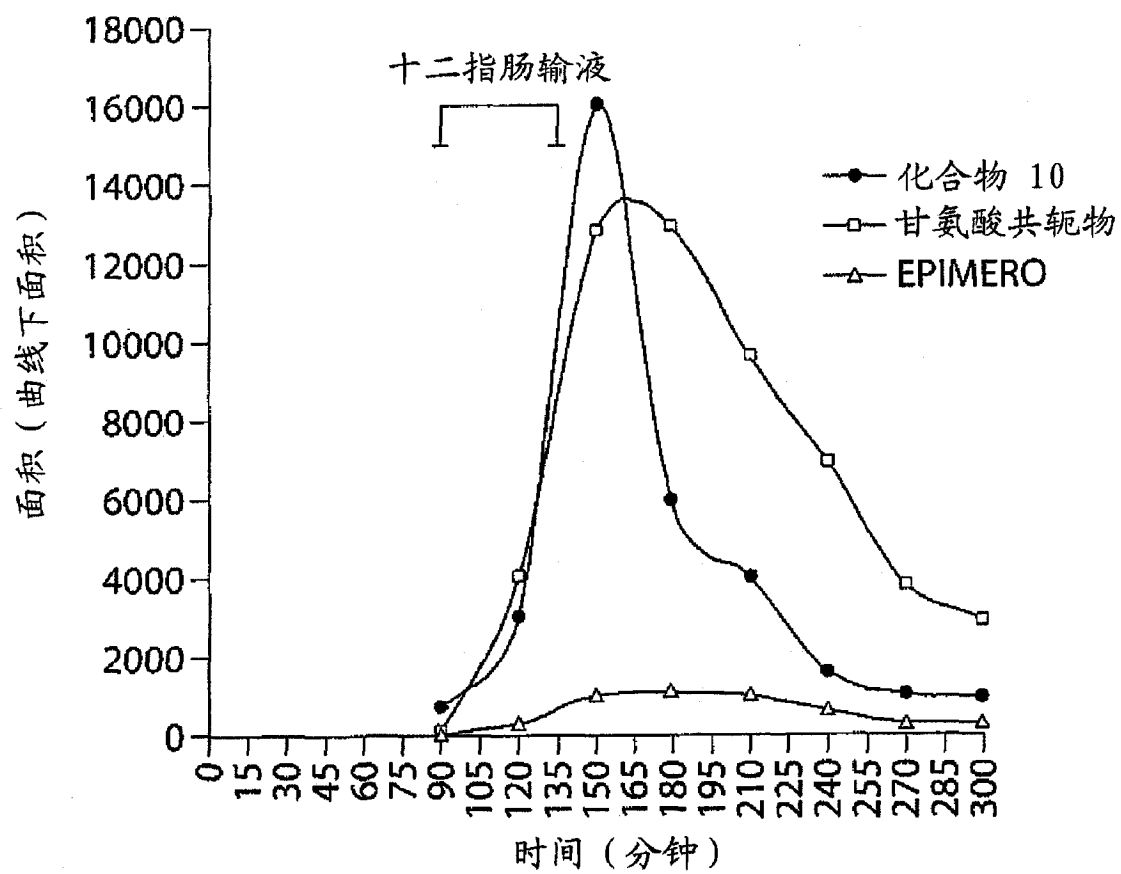


图10C