



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104853758 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201380061734. 4

A61P 11/00(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 26

A61P 11/06(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 11/08(2006. 01)

61/730, 749 2012. 11. 28 US

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/072038 2013. 11. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/085474 EN 2014. 06. 05

(71) 申请人 英特赛普特医药品公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 M·普鲁赞斯基

卢西亚诺·阿多里尼

(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.

A61K 31/575(2006. 01)

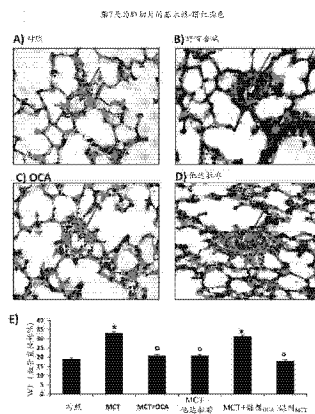
权利要求书3页 说明书26页 附图21页

(54) 发明名称

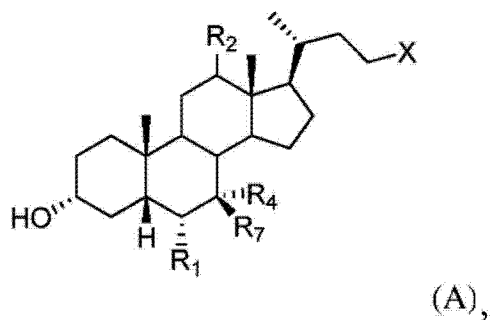
肺部疾病的治疗

(57) 摘要

本发明涉及治疗肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其症状,减少或抑制肺中的炎症,以及促进肺修复的方法,通过使用一种具有式(A)的化合物或其药学上可接受的盐来进行。



1. 一种在受试者中治疗肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其的方法,包括向该受试者给予治疗有效量的一种具有式 A 的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

R_1 是氢或未被取代的 C_1-C_6 烷基;

R_2 是氢或 α -羟基;

X 是 $C(O)OH$ 、 $C(O)NH(CH_2)_mSO_3H$ 、 $C(O)NH(CH_2)_nCO_2H$ 或 OSO_3H ;

R_4 是羟基或氢;

R_7 是羟基或氢;

m 是整数 1、2 或 3;并且

n 是整数 1、2 或 3。

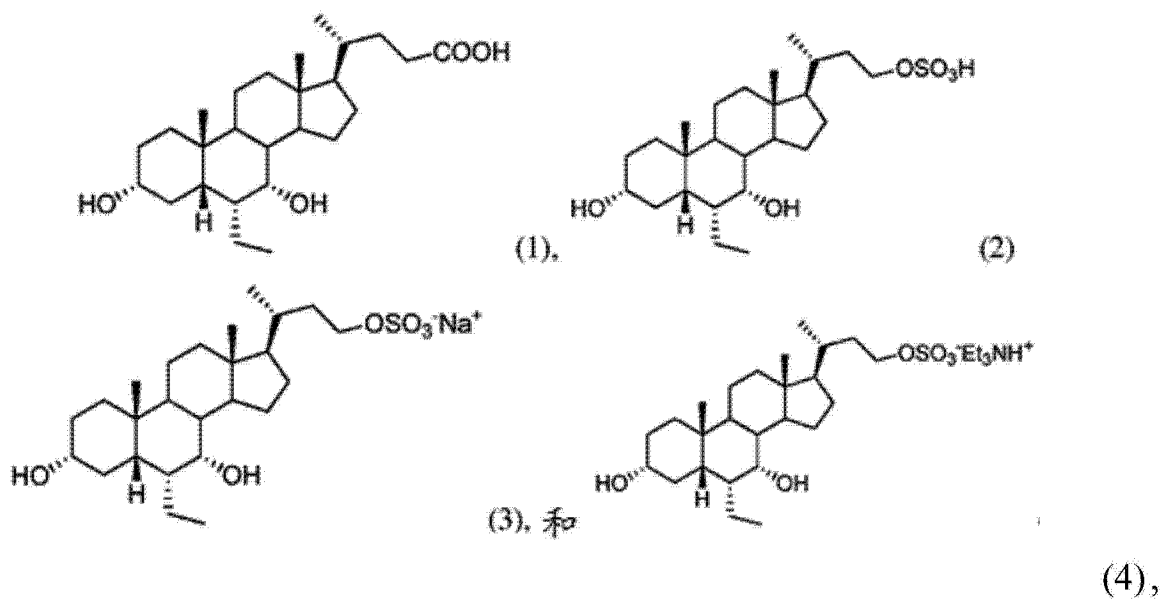
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中 R_1 是未被取代的 C_1-C_6 烷基。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其中 R_1 是甲基、乙基或丙基。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其中 R_1 是乙基。

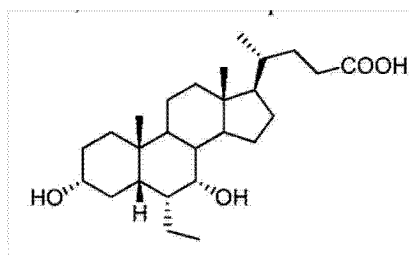
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中 R_1 选自甲基、乙基以及丙基; R_4 是 OH; R_7 是 H;并且 R_2 是 H。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中该化合物选自



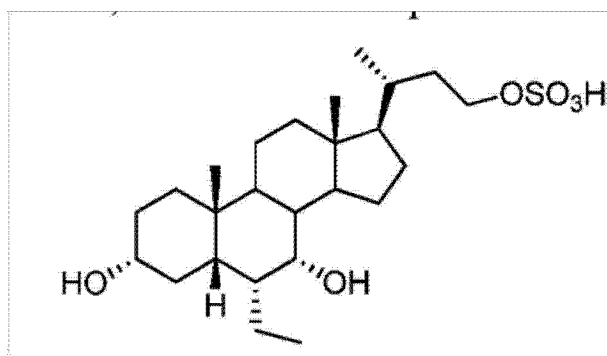
或其药学上可接受的盐。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中该化合物是



或其药学上可接受的盐。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该化合物是



或其药学上可接受的盐。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该化合物是一种药学上可接受的盐。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中该盐是钠盐或一种三乙铵盐。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该肺部疾病或病状选自阻塞性肺部疾病 (COPD)、肺气肿、哮喘、特发性肺纤维化、肺炎、肺结核、囊肿性纤维化、支气管炎、肺高血压 (例如, 特发性肺动脉高血压 (IPAH) (也称为原发性肺高血压 (PPH)) 和继发性肺高血压 (SPH))、间质性肺病以及肺癌。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中该肺部疾病或病状选自 COPD、肺气肿、哮喘、囊肿性纤维化以及肺高血压。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中该肺部疾病或病状是肺高血压。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中该肺高血压是 IPAH 或 SPH。

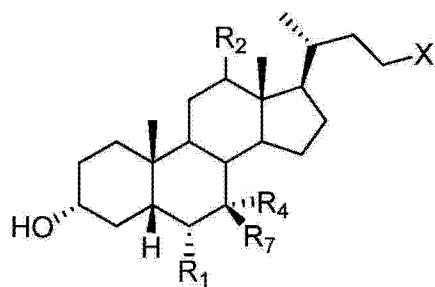
15. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该肺部疾病或病状是由炎症、自体免疫疾病、硬皮病、类风湿性关节炎、急性肺损伤 (ALI)、急性呼吸窘迫综合症 (ARDS)、心脏先天缺陷、肺中有血块 (肺栓塞)、充血性心力衰竭、心脏瓣膜疾病、HIV 感染、血液中长期低氧水平、药物、物质滥用或阻塞性睡眠呼吸暂停引起。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中该肺部疾病或病状是由炎症引起。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该受试者是一个人类。

18. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该化合物是全身地、经口、静脉内、肌肉内、腹膜内或通过吸入来给予。

19. 一种减少或抑制受试者的肺中的炎症的方法, 包括向对其有需要的该受试者给予治疗有效量的一种具有式 A 的化合物:



(A),

或其药学上可接受的盐,其中:

R₁是氢或未被取代的 C₁-C₆烷基;

R₂是氢或 α-羟基;

X 是 C(O)OH、C(O)NH(CH₂)_mSO₃H、C(O)NH(CH₂)_nCO₂H 或 OSO₃H;

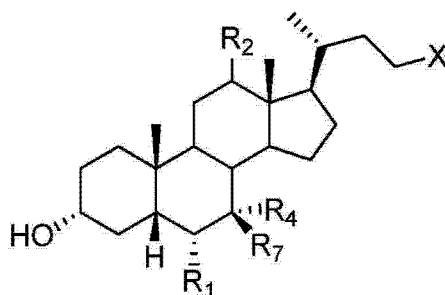
R₄是羟基或氢;

R₇是羟基或氢;

m 是 1、2 或 3;并且

n 是 1、2 或 3。

20. 一种促进受试者中的肺修复的方法,包括向对其有需要的受试者给予治疗有效量的一种具有式 A 的化合物:



(A),

或其药学上可接受的盐,其中:

R₁是氢或未被取代的 C₁-C₆烷基;

R₂是氢或 α-羟基;

X 是 C(O)OH、C(O)NH(CH₂)_mSO₃H、C(O)NH(CH₂)_nCO₂H 或 OSO₃H;

R₄是羟基或氢;

R₇是羟基或氢;

m 是 1、2 或 3;并且

n 是 1、2 或 3。

肺部疾病的治疗

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求 2012 年 11 月 28 日提交的美国申请第 61/730,749 号的优先权和权益，将其全部内容通过引用结合在此。

发明背景

[0002] 肺部疾病，通常称为肺病，在美国代表第三大死亡原因。最常诊断的肺部疾病包括肺气肿、哮喘、肺炎、肺结核、肺高血压以及肺癌。肺高血压是一种慢性及进行性的疾病。肺高血压中的关键病理性变化是小肺动脉的重塑，其特征在于内膜、中膜以及外膜的增厚。肺部微血管床的进行性变窄和血管阻力的后续增大降低其输送血液的能力并且造成压力增大。随时间推移，增大的压力诱导右心室 (RV) 的适应性肥大并且最终引起心力衰竭并且导致患者死亡。

[0003] 肺高血压可以由包括以下各项的因素的组合引起：自体免疫疾病（如硬皮病和类风湿性关节炎）、心脏先天缺陷、肺中有血块（肺栓塞）、充血性心力衰竭、心脏瓣膜疾病、HIV 感染、血液中长期低氧水平、肺病（如 COPD 和肺纤维化）、不同药物和物质滥用和 / 或阻塞性睡眠呼吸暂停。尽管肺高血压的确切病理生理学仍未知，但对于炎症以及先天性和适应性免疫的激活在肺高血压的发展和进展中的关键作用，存在越来越多的证据（普莱斯 (Price) 等人，《胸》(Chest) 2012, 141:210-221)。

[0004] 已经开发数种治疗剂用于对肺高血压进行医疗管理，包括前列腺素类、内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶 5 型抑制剂、可溶鸟苷酸环化酶刺激剂以及两种 PDE5 抑制剂他达拉非和西地那非。氧化氮 (NO) 是用于肺动脉中的平滑肌细胞的一种有效松弛剂，通过环 GMP (cGMP) 发挥其活性。细胞内 cGMP 水平取决于多种磷酸二酯酶 (PDE) 的激活，在这些磷酸二酯酶之中 PDE5 是肺循环中的最丰富地表达的同功异型物。

[0005] 急性肺损伤 (ALI) 和其更严重的形式急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的特征在于定位于肺的气隙和肺实质的一种急性发炎应答。ALI 和 ARDS 是急性呼吸衰竭的主要原因，并且与重病患者中的高发病率和死亡率相关。ARDS 可以在美国大小的一个国家造成 36,000 例死亡 / 年。尽管 ALI 和 ARDS 患者管理（如肺保护性通气）有所进步，但仍存在对于有效治疗的需要。

[0006] 类法尼醇 X 受体 (FXR) 是在不同器官（包括脂肪组织、肝脏、肾脏、肾上腺、肠道以及血管床）中高度表达的核受体超家族的一个成员（列斐伏尔 (Lefebvre), 《生理学评论》(Physiol. Rev.) 2009)。通过增加 NO 产生并且减少新生内膜增生和血管炎症，FXR 信号传导调节数种代谢途径，调控甘油三酯、胆固醇、葡萄糖以及能量稳态，并且可能影响动脉粥样硬化的发病机制（列斐伏尔, 《生理学评论》2009)。FXR 还在大鼠肺动脉内皮细胞 (EC) 中表达（何 F. (He, F.) 等人, 《循环研究》(Circulation Research) 2006, 98:192-199)。EC 中的 FXR 的激活导致内皮素 (ET)-1（一种有效血管收缩物质）表达的下调。血管 EC 中的 ET-1 表达的操纵可以适用于控制肺高血压。此外，FXR 激活抑制肺中的炎症并且促进损伤后的肺修复。FXR 基因敲除小鼠在由脂多糖治疗诱导的急性肺损伤之后展示出肺中的炎症增加和缺陷性肺再生。在体外，FXR 激活显示出抑制 P 选择素的表达并且诱导

Foxm1b 表达。这些效应一起用以在一个发炎小鼠模型中减小肺的通透性,抑制白细胞从循环中移动到发炎的组织中,并且促进肺修复(张 L. (Zhang, L.),《分子内分泌学》(Mol. Endocrinol.) 2012, 26(1):27-36)。在肺纤维化小鼠模型中观察到类似结果(周(Zhou)等人, 2013, 761-65)。这些结果支持了 FXR 或其激动剂抑制肺损伤并且促进肺修复以便治疗炎症诱导的肺损伤的潜在能力。

[0007] 因为当前治疗对于改善罹患肺部疾病(如肺高血压)的患者的存活是低效的,所以迫切地需要替代性疗法。本发明解决了此类需要。

附图简要说明

[0008] 图 1 是一幅图,示出对 Dahl 盐敏感(DSS)大鼠执行血压、尿液以及血液分析的研究概述和时程。DSS 大鼠包括四个组(参见实例 4,在此称为“DSS 研究大鼠”)。

[0009] 图 2 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的体重(克)对比时间(周)。

[0010] 图 3 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的存活率(%)对比时间(周)。

[0011] 图 4 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的心率(bpm)对比时间(周)。

[0012] 图 5 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的收缩血压(SBP ;mmHg)对比时间(周)。

[0013] 图 6A 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的体重(BW)的心脏质量%。

[0014] 图 6B 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的 BW 的肺脏质量%。

[0015] 图 6C 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的 BW 的肾脏质量%。

[0016] 图 7 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠中在葡萄糖耐量测试(GTT)期间随时间(min)的空腹血糖浓度(mg/dL)。

[0017] 图 8 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠中在 GTT 期间随时间(min)的空腹血浆胰岛素浓度(ng/mL)。

[0018] 图 9 是一幅直方图,使用胰岛素抗性(IR)指数指示 DSS 研究大鼠中的胰岛素敏感性。

[0019] 图 10A 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的尿白蛋白(mg/天)。

[0020] 图 10B 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠的尿白蛋白与肌酸酐比(UACR)。

[0021] 图 11A 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠随时间(周)的血清 ADMA 水平($\mu\text{mol/L}$)。

[0022] 图 11B 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠随时间(周)的尿 ADMA 水平(nmol/身体)。

[0023] 图 11C 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠随时间(周)的血清 NO 水平($\mu\text{mol/L}$)。

[0024] 图 11D 是一幅图,指示 DSS 研究大鼠随时间(周)的尿 NO 水平(nmol/身体)。

[0025] 图 12 是一幅图,指示每一处理组的 DSS 研究大鼠在动物处死之后的右心室肥大(RVH)程度。

[0026] 图 13A-D 是在第 7 天由对照组(A)、野百合碱处理组(B)、野百合碱加奥贝胆酸(OCA)处理组(C)以及野百合碱加他达拉非处理组(D)获取的苏木精-曙红染色的肺切片的 $20\times$ 放大图像。长箭头指示血管腔,并且短箭头指示血管壁。

[0027] 图 13E 是一幅直方图,指示如与对照组大鼠的肺动脉壁厚相比,在第 7 天经处理的大鼠中的肺动脉壁厚。 $*p<0.0001$ 对比对照, $^{\circ}p<0.0001$ 对比野百合碱,并且 n:评估的动脉的数目。

[0028] 图 14A-D 是在第 28 天由对照组(A)、野百合碱处理组(B)、野百合碱加 OCA 处理组(C)以及野百合碱加他达拉非处理组(D)获取的苏木精-曙红染色的肺切片的 $20\times$ 放大图

像。长箭头指示血管腔,并且短箭头指示血管壁。

[0029] 图 14E 是一幅直方图,指示如与对照组大鼠的肺动脉壁厚相比,在第 28 天经处理的大鼠中的肺动脉壁厚。 $*p<0.0001$ 对比对照, $^{\circ} p<0.0001$ 对比野百合碱,并且 n:评估的动脉的数目。

[0030] 图 15 是一幅图,指示在第 7 和 28 天在对照和测试组中 OCA 对 MCP-1 的 mRNA 表达的作用。

[0031] 图 16 是一幅图,指示在第 7 和 28 天在对照和测试组中 OCA 对 IL-6 的 mRNA 表达的作用。

[0032] 图 17 是一幅图,指示在第 7 和 28 天在对照和测试组中 OCA 对 VEGF 的 mRNA 表达的作用。

[0033] 图 18 是一幅图,指示在第 7 和 28 天在对照和测试组中 OCA 对 ACE2 的 mRNA 表达的作用。

[0034] 图 19 是一幅图,指示在第 7 和 28 天在对照和测试组中 OCA 对 PKG1 的 mRNA 表达的作用。

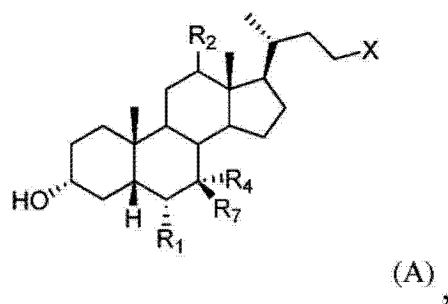
[0035] 图 20 是一幅图,指示在第 7 和 28 天在对照和测试组中 OCA 对 GC1a3 的 mRNA 表达的作用。

[0036] 图 21 是一幅图,指示在第 7 和 28 天在对照和测试组中 OCA 对 PDE5 的 mRNA 表达的作用。

[0037] 图 22 是一幅图,描绘未处理的或经处理的大鼠中的存活随时间(天)的单变量分析。

发明概述

[0038] 本发明涉及一种在受试者中治疗肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其症状的方法,包括向该受试者给予治疗有效量的一种具有式 A 的化合物:

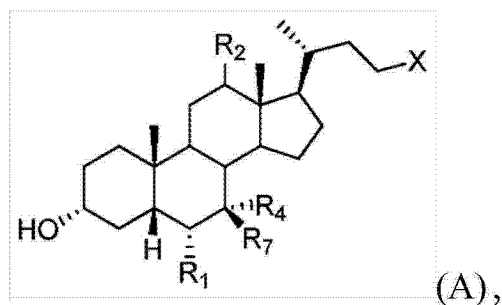


或其药学上可接受的盐,其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0039] 本发明还涉及具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制造用于在一个受试者中治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状的一种药物,其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0040] 本发明还涉及一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐,用于在一个受试者中治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状,其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0041] 本发明进一步涉及一种减少或抑制受试者的肺中的炎症的方法,包括向该受试者给予治疗有效量的一种具有式 A 的化合物:

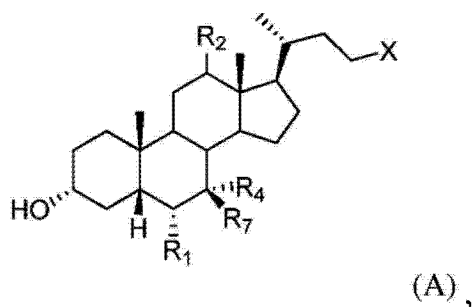


或其药学上可接受的盐,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0042] 本发明还涉及具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制造用于减少或抑制一个受试者的肺中的炎症的一种药物,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0043] 本发明还涉及一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐,用于减少或抑制一个受试者的肺中的炎症,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0044] 本发明进一步涉及一种促进受试者中的肺修复的方法,包括向该受试者给予治疗有效量的一种具有式 A 的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0045] 本发明还涉及具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制造用于促进一个受试者中的肺修复的一种药物,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0046] 本发明还涉及一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐,用于促进一个受试者中的肺修复,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0047] 本发明进一步涉及一种药物组合物,包括一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐,和一种药学上可接受的载体或赋形剂,用于在一个受试者中治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状,或减少或抑制肺中的炎症,或促进肺修复,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0048] 本发明进一步涉及一种试剂盒,包括一种本发明的化合物,用于一种在一个受试者中治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状,或减少或抑制肺中的炎症,或促进肺修复的方法中,其中 R₁、R₂、R₄、R₇以及 X 如在此所定义。

[0049] 除非另外限定,否则在此所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。在有冲突的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。在本说明书中,除非上下文另外明确规定,否则单数形式也包括复数。尽管可以在本发明的实践或测试中使用类似于或等效于在此所述的方法和材料的方法和材料,但适合的方法和材料描述如下。在此提及的所有公开、专利申请、专利以及其他参考文献通过引用结合。不承认在此所引用的参考文献是所要求的发明的现有技术。另外,材料、方法以及实例仅仅是

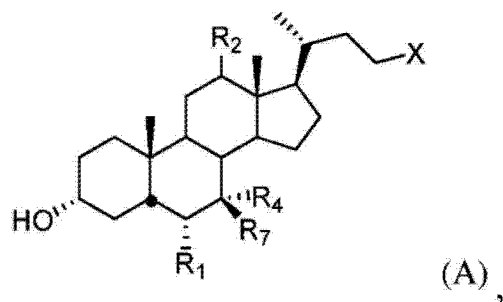
示意性的并且并不打算是限制性的。

[0050] 本发明的其他特征和优点从以下详细说明和权利要求书将是清楚的。

发明详细说明

[0051] 本发明涉及一种治疗肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其症状的方法，一种减少或抑制肺中的炎症的方法，以及一种促进肺修复的方法，通过向对其有需要的一个受试者给予一种 FXR 激动剂来进行。

[0052] 具体来说，本发明涉及一种治疗肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其症状的方法，包括向对其有需要的一个受试者给予一种具有式 A 的化合物：



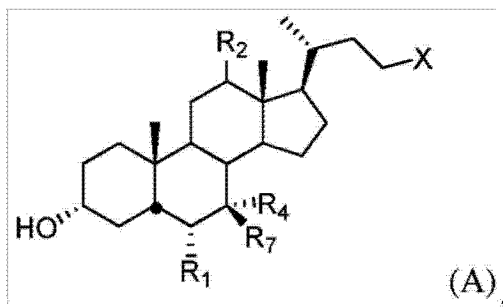
或其药学上可接受的盐，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所述。

[0053] 本发明还涉及一种减少或抑制肺中的炎症的方法，包括向对其有需要的一个受试者给予一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所述。

[0054] 本发明还涉及一种促进肺修复的方法，包括向对其有需要的一个受试者给予一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所述。

[0055] 在一个实施例中，本发明的方法包括向对其有需要的一个受试者给予一种如在此所述的化合物。举例来说，化合物是一种如第 [00067]–[00082] 段中所描述的化合物。

[0056] 本发明进一步涉及具有式 A 的化合物：



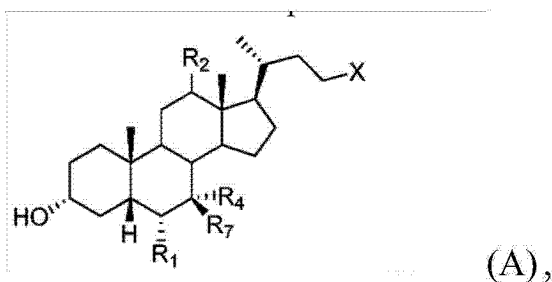
或其药学上可接受的盐的用途，用于制造用于在一个受试者中治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状的一种药物，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0057] 本发明还涉及具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐的用途，用于制造用于减少或抑制一个受试者的肺中的炎症的一种药物，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0058] 本发明还涉及一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐，用于促进一个受试者中的肺修复，其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0059] 在一个实施例中，用于本发明的用途用于制造一种药物的化合物是一种如在此所述的化合物。举例来说，化合物是一种如第 [00067]–[00082] 段中所描述的化合物。

[0060] 本发明还涉及一种具有式 A 的化合物：



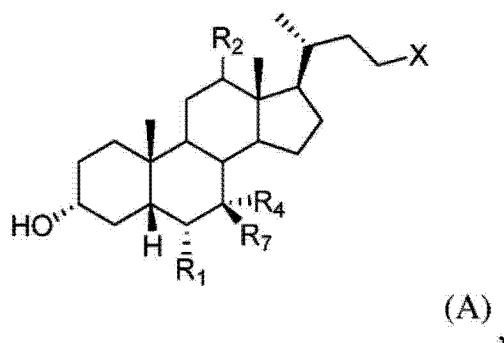
或其药学上可接受的盐,用于在一个受试者中治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状,其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0061] 本发明还涉及一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐,用于减少或抑制一个受试者的肺中的炎症,其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0062] 本发明还涉及一种具有式 A 的化合物或其药学上可接受的盐,用于促进一个受试者中的肺修复,其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_7 以及 X 如在此所定义。

[0063] 在一个实施例中,用于治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状,或用于减少或抑制肺中的炎症,或用于促进肺修复的化合物是一种如在此所述的化合物。举例来说,化合物是一种如第 [00067]–[00082] 段中所描述的化合物。

[0064] 用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物：



或其药学上可接受的盐,其中：

R_1 是氢或未被取代的 C_1 – C_6 烷基；

R_2 是氢或 α -羟基；

X 是 $C(O)OH$ 、 $C(O)NH(CH_2)_mSO_3H$ 、 $C(O)NH(CH_2)_nCO_2H$ 或 OSO_3H ；

R_4 是羟基或氢；

R_7 是羟基或氢；

m 是 1、2 或 3；并且

n 是 1、2 或 3。

[0065] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物的一种盐。在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物的一种阳离子盐,其中 X 转化为相对应的阴离子。举例来说, X 转化为选自以下各项的一种阴离子： $C(O)O^-$ 、 $C(O)NH(CH_2)_mSO_3^-$ 、 $C(O)NH(CH_2)_nCO_2^-$ 或 OSO_3^- 。

[0066] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物的一种钠盐,例如 X 转化为 OSO_3^- 并且与 Na^+ 形成一种盐的一种具有式 A 的化合物。在一个实施例中,用

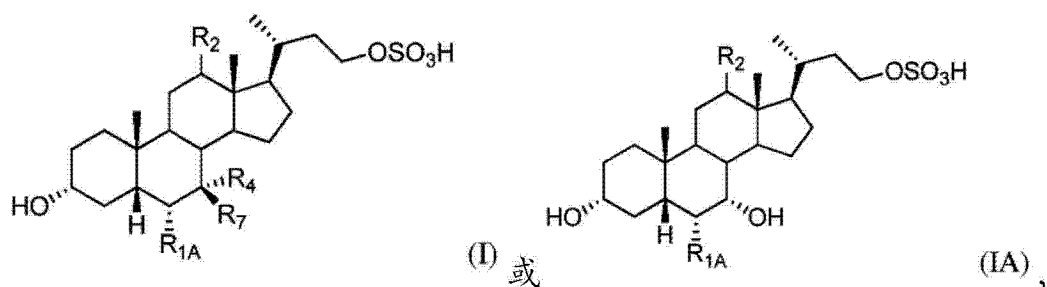
于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物的一种三乙铵盐,例如 X 转化为 OSO_3^- 并且与 Et_3NH^+ 形成一种盐的一种具有式 A 的化合物。

[0067] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 R_1 是未被取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 R_1 是未被取代的 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 R_1 选自甲基、乙基以及丙基。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 R_1 是乙基。

[0068] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 X 选自 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ 以及 $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ 。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 X 选自 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$ 。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 X 是 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 X 是 OSO_3H 。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 X 是 $\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$ 。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 X 是 $\text{OSO}_3^-\text{NHEt}_3^+$ 。

[0069] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A 的化合物,其中 R_1 选自甲基、乙基以及丙基, R_4 是 OH , R_7 是 H , 并且 R_2 是 H 。

[0070] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 I 或 IA 的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中

R_{1A} 是氢或未被取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基;

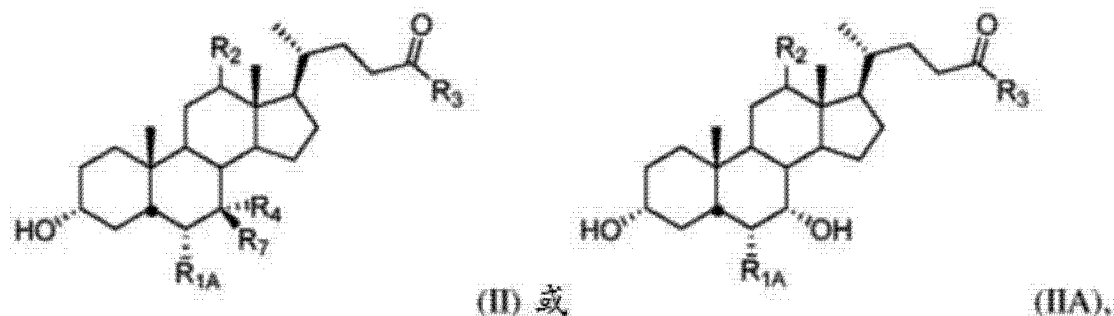
R_2 是氢或 α -羟基;

R_4 是羟基或氢;并且

R_7 是羟基或氢。

[0071] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种式 I 或 IA 的钠盐。在一个实施例中,本发明的化合物是一种具有式 I 或 IA 的化合物的一种三乙铵盐。

[0072] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 II 或 IIA 的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

R_{1A} 是氢或未被取代的 C_1-C_6 烷基;

R_2 是氢或 α -羟基;

R_3 是羟基、 $NH(CH_2)_mSO_3H$ 或 $NH(CH_2)_nCO_2H$;

R_4 是羟基或氢;并且

R_7 是羟基或氢。

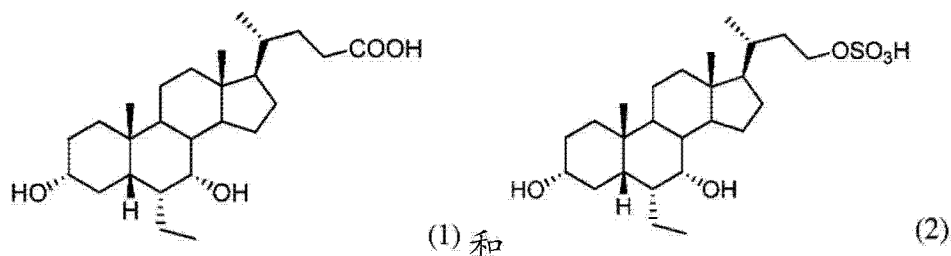
[0073] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 II 或 IIA 的化合物,其中 R_3 选自 OH 、 $NH(CH_2)_mSO_3H$ 、 $NH(CH_2)_nCO_2H$ 、 $NH(CH_2)_2SO_3H$ 以及 $NH(CH_2)_2CO_2H$ 。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 II 或 IIA 的化合物,其中 R_3 是 OH 。

[0074] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A、I、IA、II 或 IIA 的化合物,其中 R_2 是氢。

[0075] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 A、I 或 II 的化合物,其中 R_4 是羟基并且 R_7 是氢。

[0076] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 I、IA、II 或 IIA 的化合物,其中 R_{1A} 是未被取代的 C_1-C_6 烷基。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 I、IA、II 或 IIA 的化合物,其中 R_{1A} 是未被取代的 C_1-C_3 烷基。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 I、IA、II 或 IIA 的化合物,其中 R_{1A} 选自甲基、乙基以及丙基。在另一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种具有式 I、IA、II 或 IIA 的化合物,其中 R_{1A} 是乙基。

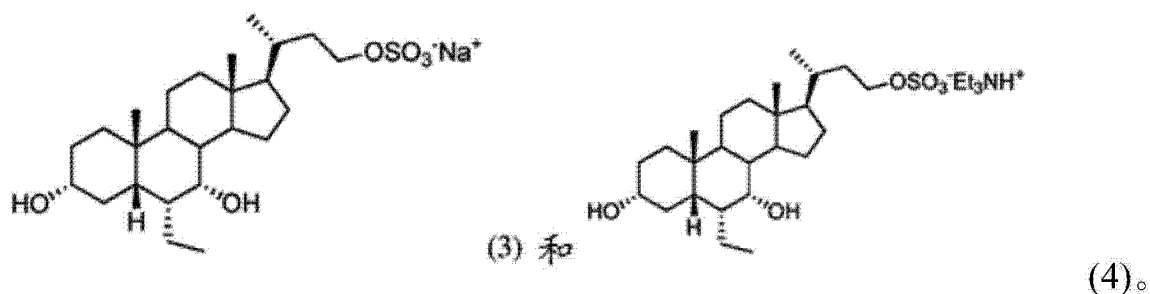
[0077] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种选自以下各项的化合物



或其药学上可接受的盐。

[0078] 化合物 1 也称为 6ECDCA 或奥贝胆酸 (OCA)。

[0079] 在一个实施例中,用于本发明中的化合物是一种选自以下各项的化合物



[0080] 式 I、IA、II 或 IIA 化合物是具有式 A 的化合物的子组。在此关于具有式 A 的化合物所述的特征同样适用于具有式 I、IA、II 或 IIA 的化合物。

[0081] 本发明化合物可以容易由本领域的普通技术人员制备。具体来说,本发明的化合物可以根据美国专利第 7786102 号、第 7994352 号和 / 或第 7932244 号中公开的程序制备。

[0082] 在此所述的化合物适用于治疗多种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状。肺部疾病和病状被认为是影响身体中的肺部或肺系统的疾病和病状。在不打算受理论束缚的情况下,本发明的化合物适用于通过增加 NO 产生、下调内皮素 (ET)-1、减小肺的通透性和 / 或抑制白细胞或纤维细胞从循环移动到发炎的组织,来治疗多种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其症状。

[0083] 在一个实施例中,在此所述的化合物适用于治疗由以下各项引起或与以下各项相关的肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状:炎症、自体免疫疾病(如硬皮病和类风湿性关节炎)、急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、心脏先天缺陷、肺中有血块(肺栓塞)、充血性心力衰竭、心脏瓣膜疾病、HIV 感染、血液中长时间低氧水平、不同药物和物质滥用和 / 或阻塞性睡眠呼吸暂停。在一个实施例中,肺部疾病或病状由肺的炎症引起或与其相关。在另一个实施例中,肺部疾病或病状由 ALI 或 ARDS 引起或与其相关。

[0084] 在一个实施例中,在此所述的化合物适用于治疗由对肺的损害或损伤引起或与对肺的损害或损伤相关的肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状。在一个实施例中,对肺的损害或损伤是例如药物使用、物质滥用或一种医学病状的一种结果。在一个实施例中,对肺的损害或损伤给肺带来炎症。

[0085] 在一个实施例中,在此所述的化合物适用于治疗由肺血管变窄引起或与肺血管变窄相关的肺部疾病和病状、降低其风险、预防其或缓解其一种症状。在一个实施例中,肺血管变窄是例如药物使用、物质滥用或一种医学病状的一种结果。在一个实施例中,肺血管(例如,动脉、静脉以及毛细管)变窄导致流动通过血管的血液的量减少。在一个实施例中,肺血管变窄导致流动通过肺血管的血液的压力增大。

[0086] 肺部疾病和病状包括(但不限于)慢性阻塞性肺部疾病(COPD)、肺气肿、哮喘、特发性肺纤维化、肺炎、肺结核、囊肿性纤维化、支气管炎、肺高血压(例如,特发性肺动脉高血压(IPAH)(也称为原发性肺高血压(PPH))和继发性肺高血压(SPH))、间质性肺病以及肺癌。

[0087] 当使肺中的肺泡排成行的间质组织变得有疤痕时,出现一种间质性肺病。疤痕导致这些组织有炎症,影响其吸收氧的能力。间质性肺病的病因包括(但不限于)环境污染物、由外伤或感染引起的肺组织损伤以及不同结缔组织疾病。

[0088] 哮喘影响全世界从儿童到老人的数百万个体。哮喘由气管中的肌肉的收缩、过量的粘液产生以及肺的气管或分支的肿胀或炎症引起。气管收缩和炎症导致到达肺的空气流量减少,这通常可以通过具有一个哮喘发作的一个人可以发出的喘鸣声而注意到。哮喘的治疗和管理以个性化为基础而确定,并且受制于包括患者所经历的哮喘发作的严重程度和频率的考虑因素。

[0089] 支气管炎是肺中的细支气管的一种慢性感染。细支气管含有肺泡,它在呼吸期间负责气体交换。当细支气管变得感染时,免疫系统应答在气管中导致肿胀和粘液产生增加,使得难以呼吸。支气管炎还与一种慢性疼痛性咳嗽一起呈现。

[0090] 肺气肿也影响肺泡,该影响的程度使得构成其的细胞被完全破坏。肺气肿还破坏肺中的绒毛。绒毛是将外来物质从肺中推出的毛发样结构。当它们死亡时,肺具有增加的感染机率。肺气肿的影响是永久性的,并且导致终身呼吸困难。

[0091] COPD 的最常见形式之一是肺气肿。COPD 损害肺中的肺泡,这些肺泡是在将氧气输送到囊的肺分支的末端处所见的小气囊。稀薄的囊壁抑制充足氧气流入和流出囊,导致持续呼吸短促。

[0092] 囊肿性纤维化是本质上遗传性的另一种常见肺部疾病,意指该病状通常通过家族线传下去。一种基因突变导致肺吸收过量的水和钠,导致肺中的流体积聚,这降低其为了最优机能而吸收足够氧气的的能力。这一病状随肺细胞变得愈加受损并且最终死亡而逐渐恶化。

[0093] 特发性肺纤维化 (IPF) (或隐源性致纤维化性肺炎 (CFA)) 是一种慢性进行性形式的肺病,其特征在于肺的支撑框架 (间质) 的纤维化。按照定义,该术语仅当肺纤维化的原因未知 (“特发性”) 时使用。

[0094] 肺结核是可以通过空气从人传播到人的疾病。它是肺的一种细菌感染。需要抗肺结核药来极有效地杀死细菌。然而,肺结核的一些菌株已经产生了对用于治疗该疾病的抗细菌药物的抗性。

[0095] 在一个实施例中,在此所述的化合物适用于治疗以下各项、降低其风险、预防其或缓解其一种症状:一种间质性肺病、哮喘、支气管炎、COPD、肺气肿、囊肿性纤维化、IPF、肺结核或肺高血压 (例如, IPAH、PPH 以及 SPH)。

[0096] 在一个实施例中,在此所述的化合物适用于治疗以下各项、降低其风险、预防其或缓解其一种症状: COPD、肺气肿、哮喘、囊肿性纤维化或肺高血压 (例如, IPAH、PPH 以及 SPH)。

[0097] 在一个实施例中,在此所述的化合物适用于治疗肺高血压、降低其风险、预防其或缓解其。

[0098] 在此所述的化合物还适用于减少或抑制肺中的炎症。“抑制 (Suppressing)”、“抑制 (suppress)”或“抑制 (suppression)”意指阻止炎症出现、恶化、持久化、持续或复发。“减少 (Reducing)”、“减少 (reduce)”或“减少 (reduction)”意指减小炎症的严重程度、频率或长度。在不打算受理论束缚的情况下,本发明的化合物通过减小肺的通透性和 / 或抑制白细胞或纤维细胞从循环移动到发炎的组织,来减少或抑制炎症。

[0099] 在此所述的化合物还适用于促进肺修复或恢复。“促进 (Promoting)”或“促进 (promote)”意指减少肺从对肺的损伤或损害修复或恢复的时间或增加肺修复或恢复的程度。在一个实施例中,化合物通过减少或抑制肺中的炎症来促进肺修复或恢复。

[0100] 在一个实施例中,在此所述的化合物是 FXR 激动剂。一种 FXR 激动剂意指本发明的化合物模拟 FXR 受体的作用。举例来说,本发明的化合物结合到与 FXR 相同的一种或多种受体或一种或多种细胞靶。举例来说,本发明的化合物调控或触发 FXR 信号传导途径。在一个实施例中,在此所述的化合物通过调控或触发 FXR 信号传导途径而适用于本发明的方法和用途。

[0101] 在一个实施例中,在此所述的化合物减少从循环移动到肺或到肺中的损伤位置的纤维细胞的数目。在一个实施例中,在此所述的化合物减少由肺中或肺中的损伤位置处的纤维细胞产生的一种蛋白质、一种肽或一种趋化因子的量。在一个实施例中,在此所述的化合物减少由肺中或肺中的损伤位置处的纤维细胞产生的胶原蛋白 I 或 CXCL12 的量。

[0102] 在一个实施例中,在此所述的化合物通过减少从循环移动到肺或到肺中的损伤位

置的纤维细胞的数目而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过减少由肺中或肺中的损伤位置处的纤维细胞产生的一种蛋白质、一种肽或一种趋化因子的量而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过减少由肺中或肺中的损伤位置处的纤维细胞产生的胶原蛋白 I 或 CXCL12 的量而适用于本发明的方法和用途。

[0103] 在一个实施例中,在此所述的化合物增加二甲基精氨酸二甲氨基水解酶 (DDAH) 的表达。在一个实施例中,在此所述的化合物减少 ω -N[°], N[°]- 不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 的量。

[0104] 在一个实施例中,在此所述的化合物通过增加 DDAH 的表达而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过减少 ADMA 的量而适用于本发明的方法和用途。

[0105] 在一个实施例中,在此所述的化合物降低胰岛素敏感性。在一个实施例中,在此所述的化合物通过降低胰岛素敏感性而适用于本发明的方法和用途。

[0106] 在一个实施例中,在此所述的化合物调控炎症中所涉及的一种基因的表达。在一个实施例中,在此所述的化合物减少一种促炎性因子的表达。在一个实施例中,在此所述的化合物减少 IL-6 或单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) 的表达。

[0107] 在一个实施例中,在此所述的化合物通过调控炎症中所涉及的一种基因的表达而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过减少一种促炎性因子的表达而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过减少 IL-6 或 MCP-1 的表达而适用于本发明的方法和用途。

[0108] 在一个实施例中,在此所述的化合物调控内皮增生中所涉及的一种基因的表达。在一个实施例中,在此所述的化合物增加一种内皮增生性因子的表达。在一个实施例中,在此所述的化合物增加 VEGF 或 ACE2 的表达。

[0109] 在一个实施例中,在此所述的化合物通过调控内皮增生中所涉及的一种基因的表达而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过增加一种内皮增生性因子的表达而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过增加 VEGF 或 ACE2 的表达而适用于本发明的方法和用途。

[0110] 在一个实施例中,在此所述的化合物调控 NO 信号传导中所涉及的一种基因的表达。在一个实施例中,在此所述的化合物增加 NO 信号传导中所涉及的一种基因的表达。在一个实施例中,在此所述的化合物增加 GC1a3、GC1b3、PKG1 或 PDE5 的表达。

[0111] 在一个实施例中,在此所述的化合物通过调控 NO 信号传导中所涉及的一种基因的表达而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过增加 NO 信号传导中所涉及的一种基因的表达而适用于本发明的方法和用途。在一个实施例中,在此所述的化合物通过增加 GC1a3、GC1b3、PKG1 或 PDE5 的表达而适用于本发明的方法和用途。

[0112] 如在此所用,以下定义是可适用的。

[0113] “烷基”以及具有前缀“烷”的其他基团(如烷氧基和烷酰基)意指除非碳链另外定义,否则可以是直链或支链和其组合的碳链。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异、仲和叔丁基、戊基以及己基等。

[0114] 本发明的范围内的化合物可以含有手性中心并且因此能够以外消旋体、外消旋混

合物、非对映异构体以及单一对映异构体形式存在。所有此类形式应理解为在本发明的范围内。

[0115] 如在此所用,术语“一种本发明的化合物”或“本发明的化合物”应理解为包括一种具有式 A、I、IA、II 以及 IIA 中的任一者的化合物或一种药学上可接受的盐形式和在此明确披露的任何化合物。

[0116] 本发明的化合物可以按母体形式或以其药学上可接受的盐形式给予。药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的一种母体化合物制备。酸加成盐将包括(但不限于)盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乙酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、葡萄糖二酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐以及双羟萘酸盐(即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。本发明的某些化合物可以与不同氨基酸形成药学上可接受的盐。适合的碱盐包括(但不限于)铝、钙、锂、镁、钾、钠、锌、二乙醇胺、二乙氨基以及三乙氨基盐。关于药学上可接受的盐的综述,参见 S. M. 贝尔奇(S. M. Berge), L. D. 比格利(L. D. Bighley)以及 D. C. 蒙克豪斯(D. C. Monkhouse), 药物盐(Pharmaceutical Salts),《药物科学杂志》(J. Pharm. Sci.), 66(1977), 1-19; 和 P. H. 斯塔尔(P. H. Stahl)和 C. G. 韦穆特(C. G. Wermuth)(编), 药物盐:性质、选择以及用途(Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use), 德国魏因海姆:威利(Weinheim, Germany: Wiley)和苏黎世:海尔维提卡化学学报出版社(Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta), 2002[ISBN 3-906390-26-8], 通过引用结合在此。对母体化合物或其一种盐的任何提及应理解为包括化合物的所有水合物和母体化合物的所有多晶形式。

[0117] 本发明提供在一个受试者中治疗肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其症状,或减少或抑制肺中的炎症,或促进肺修复的方法。化合物适用于治疗牵涉炎症和/或免疫应答的激活的所有形式的肺部疾病和病状。化合物还适用于治疗牵涉 NO 产生增加、内皮素(ET)-1 下调、肺的通透性减小、白细胞或纤维细胞从循环向发炎的组织的移动抑制或其任何组合的所有形式的肺部疾病和病状。

[0118] 本发明还针对一种用于制造用于以下各项的药物的方法:在受试者中治疗一种肺部疾病或病状、降低其风险、预防其或缓解其,或减少或抑制肺中的炎症,或促进肺修复。

[0119] 如在此所用,“受试者”意指一个人类或动物(在一个动物的情况下,更典型地是一个哺乳动物)。在一个方面中,受试者是一个人类。一个受试者可以被认为需要治疗。

[0120] 如在此所用,一种“药学上可接受的赋形剂”或一种“药学上可接受的载体”意指参与向药物组合物提供形式或稠度的一种药学上可接受的物质、组合物或媒剂。每一赋形剂或载体当共混时必须与药物组合物的其他成分相容,以便避免将会实质上降低本发明的化合物当向一个受试者给予时的功效的相互作用和将会导致药物组合物不是药学上可接受的相互作用。另外,每一赋形剂或载体当然必须具有足够高的纯度以致使其药学上可接受。

[0121] 一种本发明的化合物可以按一种药物组合物形式给予。一种本发明的化合物和一种药学上可接受的赋形剂或诸多赋形剂将典型地配制成为适于通过所希望的给药途径向受试者给予的一种剂型。举例来说,剂型包括适于以下各项的那些:(1) 经口给药,如片剂、胶

囊、囊片、丸剂、糖衣锭、散剂、糖浆、酏剂、悬浮液、溶液、乳液、药囊以及扁囊剂；(2) 肠胃外给药，如无菌溶液、悬浮液以及用于复水的散剂；(3) 透皮给药，如透皮贴片；(4) 经直肠给药，如栓剂；(5) 吸入，如气雾剂、溶液以及干燥散剂；以及 (6) 局部给药，如乳膏、软膏、洗剂、溶液、糊剂、喷雾剂、泡沫、凝胶以及贴片。

[0122] 适合的药学上可接受的赋形剂将取决于所选择的具体剂型而不同。另外，适合的药学上可接受的赋形剂可以出于它们在组合物中可以提供一种具体功能而被选择。举例来说，某些药学上可接受的赋形剂可以出于其促进均一剂型产生的能力而被选择。某些药学上可接受的赋形剂可以出于其促进稳定剂型产生的能力而被选择。某些药学上可接受的赋形剂可以出于其促进将本发明的一种或多种化合物在向受试者给予后从一个器官或身体部分携载或输送到另一个器官或身体部分的能力而被选择。某些药学上可接受的赋形剂可以出于其增强顺应性的能力而被选择。

[0123] 适合的药学上可接受的赋形剂包括以下类型的赋形剂：稀释剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、造粒剂、涂布剂、湿润剂、溶剂、共溶剂、悬浮剂、乳化剂、甜味剂、调味剂、掩味剂、着色剂、防结块剂、保湿剂、螯合剂、增塑剂、粘度增加剂、抗氧化剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂以及缓冲剂。熟练的业内人士将了解，某些药学上可接受的赋形剂可以提供多于一种功能并且可以取决于多少赋形剂存在于配制品中和什么其他成分存在于配制品中而提供替代性功能。

[0124] 熟练的业内人士拥有本领域中的知识和技术以使得他们能够选择适当量的适合药学上可接受的赋形剂用于本发明中。另外，熟练的业内人士可获得描述药学上可接受的赋形剂并且可以适用于选择适合的药学上可接受的赋形剂的多种资源。实例包括《雷明顿医药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) (马克出版公司 (Mack Publishing Company))、《医药添加剂手册》(The Handbook of Pharmaceutical Additives) (高尔出版有限公司 (Gower Publishing Limited)) 以及《医药赋形剂手册》(The Handbook of Pharmaceutical Excipients) (美国医药协会 (American Pharmaceutical Association) 和医药出版社 (Pharmaceutical Press))。

[0125] 本发明的药物组合物使用本领域的普通技术人员已知的技术和方法制备。本领域中常用的一些方法描述于《雷明顿医药科学》(马克出版公司) 中。

[0126] 本发明的化合物还可以与作为靶向药物载体的可溶聚合物偶合。此类聚合物可以包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酸酯 - 苯酚、聚羟乙基天冬酰胺 - 苯酚或被棕榈酰基残基取代的聚氧乙烯聚赖氨酸。此外，本发明的化合物可以偶合到适用于实现一种药物的控制释放的一类生物可降解聚合物，例如聚乳酸、聚 ϵ 己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯以及水凝胶的交联或两亲性嵌段共聚物。

[0127] 在一个实施例中，本发明针对一种固体经口剂型，如一种片剂或胶囊，包括安全并且有效量的一种本发明的化合物和一种稀释剂或填充剂。适合的稀释剂和填充剂包括乳糖、蔗糖、右旋糖、甘露糖醇、山梨糖醇、淀粉（例如玉米淀粉、马铃薯淀粉以及预胶凝化淀粉）、纤维素和其衍生物（例如微晶纤维素）、硫酸钙以及磷酸氢钙。经口固体剂型可以进一步包括一种粘合剂。适合的粘合剂包括淀粉（例如玉米淀粉、马铃薯淀粉以及预胶凝化淀粉）、明胶、阿拉伯胶、海藻酸钠、海藻酸、黄蓍胶、瓜尔胶、聚维酮以及纤维素和其衍生物

(例如微晶纤维素)。经口固体剂型可以进一步包括一种崩解剂。适合的崩解剂包括交联聚维酮、羟基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素、海藻酸以及羧甲基纤维素钠。经口固体剂型可以进一步包括一种润滑剂。适合的润滑剂包括硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸钙以及滑石。

[0128] 适当时,用于经口给药的剂量单位配制品可以被微囊封。组合物还可以如例如通过将微粒物质包覆或包埋于聚合物、蜡等中而制备以延长或维持释放。

[0129] 在另一个实施例中,本发明针对一种液体经口剂型。经口液体(如溶液、糖浆以及酞剂)可以以单位剂型制备,使得给出的量含有预定量的一种本发明的化合物。糖浆可以通过将本发明的化合物溶解于一种适合地调味的水溶液中而制备,而酞剂通过使用一种无毒酒精性媒剂而制备。悬浮液可以通过将本发明的化合物分散于一种无毒媒剂中而配制。还可以添加增溶剂和乳化剂(如乙氧基化异硬脂醇和聚氧乙烯山梨糖醇醚)、防腐剂、风味添加剂(如薄荷香精油)或天然甜味剂或糖精或其他人造甜味剂等。

[0130] 在另一个实施例中,本发明针对经口吸入或鼻内给药。用于此类给药的适当剂型(如一种气雾剂配制品或一种计量剂量吸入器)可以通过常规技术制备。

[0131] 对于通过吸入给药,化合物可以从加压包装或一个喷雾器以一种气雾剂喷雾呈现形式递送,其中使用一种适合的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、一种氢氟烷烃(如四氟乙烷或七氟丙烷)、二氧化碳或其他适合气体。在一种加压气雾剂的情况下,可以通过提供用以递送计量数量的一个阀门来测定剂量单位。可以配制含有一种本发明的化合物与一种适合粉末基剂(如乳糖或淀粉)的一种粉末混合物的明胶胶囊和药筒用于一个吸入器或吹入器。

[0132] 用于通过吸入局部递送到肺的干粉组合物可以例如以用于一个吸入器或吹入器中的例如明胶胶囊和药筒或例如层压铝箔的泡壳形式呈现。粉末共混物配制品通常含有用于吸入本发明的化合物和一种适合粉末基剂(载体/稀释剂/赋形剂物质)(如单、二或聚糖(例如,乳糖或淀粉))的一种粉末混合物。每个胶囊或药筒通常可以含有 20 μ g-10mg 之间的本发明的化合物,任选地与另一种治疗活性成分组合。可替代地,本发明的化合物可以在无赋形剂的情况下呈现。

[0133] 适合地,包装/药物分配器是选自下组的一种类型,该组由以下各项组成:一个储槽干粉吸入器(RDPI)、一个多剂量干粉吸入器(MDPI)以及一个计量剂量吸入器(MDI)。

[0134] 储槽干粉吸入器(RDPI)意指一种吸入器,具有适用于包含干粉形式的多重(未计量剂量)的药物的一种储槽形式包装并且包括用于计量从储槽到一个递送位置的药物剂量的构件。计量构件可以例如包括一个计量杯,它从可以用来自储槽的药物填充杯子所处的一个第一位置可移动到使计量药物剂量可用以供受试者吸入所处的一个第二位置。

[0135] 多剂量干粉吸入器(MDPI)意指一种吸入器,适用于分配干粉形式的药物,其中药物包含在含有(或以其他方式携载)多重限定剂量(或其部分)的药物的一个多剂量包装内。在一个实施例中,载体具有一种泡壳包装形式,但它还可以例如包括一种基于胶囊的包装形式或一种载体,药物已经通过任何适合工艺(包括印刷、涂刷以及真空闭塞)涂覆到该载体上。

[0136] 在多剂量递送的情况下,配制品可以被预计量(例如,如在迪斯库斯(Diskus)中,参见 GB 2242134、美国专利第 6,632,666 号、第 5,860,419 号、第 5,873,360 号以及第 5,590,645 号,或在碟式吸入器(Diskhaler)中,参见 GB 2178965、2129691 以及 2169265、

美国专利第 4,778,054 号、第 4,811,731 号以及第 5,035,237 号,这些专利中的每一者的披露内容特此通过引用结合)或在使用中被计量(例如,如在都保吸入器(Turbuhaler)中,参见 EP 69715,或在描述于美国专利第 6,321,747 号中的装置中,这些专利中的每一者的披露内容特此通过引用结合)。一种单位剂量装置的一个实例是旋转式吸入器(Rotahaler)(参见 GB 2064336 和美国专利第 4,353,656 号,这些专利中的每一者的披露内容特此通过引用结合)。

[0137] 迪斯库斯吸入装置包括一个伸长的条带,由具有沿着其长度间隔开的多个凹槽的一个基片和与其气密性地但可剥离地密封以限定多个容器的一个盖片形成,每个容器在其中具有含有一种本发明的化合物任选地与乳糖组合的一种可吸入配制品。条带足够柔性以卷绕成一个辊。盖片和基片将优选地具有前端部分,它们不彼此密封并且所述前端部分中的至少一者被构建以连接到一个卷绕构件。此外,基片与盖片之间的气密密封在其整个宽度上延伸。盖片可以优选地由基片在一个纵向上从所述基片的一个第一端剥离。

[0138] 在一个实施例中,多剂量包装是一种泡壳包装,包括用于容纳干粉形式的药物的多个泡壳。泡壳典型地以规则方式安排以便于从其释放药物。

[0139] 在一个实施例中,多剂量泡壳包装包括以大体上圆形方式安排于一个碟形式的泡壳包装上的多个泡壳。在另一个实施例中,多剂量泡壳包装的形式是伸长的,例如包括一个条带或一个胶带。

[0140] 在一个实施例中,多剂量泡壳包装限定于可剥离地固定到彼此的两个部件之间。美国专利第 5,860,419 号、第 5,873,360 号以及第 5,590,645 号描述了这种通用类型的药物包装。装置通常具备一个开放台站,包括用于将部件剥离开以获取每个药物剂量的剥离构件。适合地,装置适于用于如下情况:可剥离部件是伸长的薄片,它们限定沿着其长度间隔开的多个药物容器,装置具备转而用于索引每个容器的索引构件。此外,装置适于用于如下情况:薄片之一是在其中具有多个口袋的一个基片,并且另一个薄片是一个盖片,每个口袋和盖片的相邻部分限定容器的一个对应者,装置包括用于在开放台站处将盖片与基片拉开的驱动构件。

[0141] 计量剂量吸入器(MDI)意指适用于分配气雾剂形式的药物的一种药物分配器,其中药物包含于适用于含有一种基于推进剂的气雾剂药物配制品的一个气雾剂容器中。气雾剂容器典型地具备一个计量阀,例如一个滑阀,用于向受试者释放气雾剂形式药物配制品。气雾剂容器通常被设计成在借助于阀门的每个致动后递送预定剂量的药物,该阀门可以或者通过按压阀门同时使容器保持静止或者通过按压容器同时使阀门保持静止而打开。

[0142] 在药物容器是一个气雾剂容器时,阀门典型地包括一个阀体,该阀体具有一个入口端,一种药物气雾剂配制品可以通过其进入所述阀体;一个出口端,气雾剂可以通过其离开阀体;以及一个打开/关闭机构,借助于其可控制通过所述出口端的流量。阀门可以是一个滑阀,其中打开/关闭机构包括一个密封环并且密封环可接受具有一个分配通道的一个阀杆,阀杆在环内从一个阀门(关闭)可滑动地移动到一个阀门(打开位置),其中阀体的内部经由分配通道与阀体的外部连通。

[0143] 典型地,阀门是一个计量阀。计量体积典型地是从 10 到 100 μl ,如 25 μl 、50 μl 或 63 μl 。在一个方面中,阀体限定一个计量腔,用于计量药物配制品的量;和一个打开/关闭机构,借助于其可控制通过入口端到计量腔的流量。优选地,阀体具有经由一个第二入口

端与计量腔连通的一个取样腔,所述入口端借助于一个打开/关闭机构可控制,由此调控进入计量腔中的药物配制品的流量。

[0144] 阀门还可以包括一个“自由流动气雾剂阀门”,该阀门具有一个腔室和延伸到腔室中并且相对于腔室在分配与非分配位置之间可移动的一个阀杆。阀杆具有一种构型并且腔室具有一种内部构型,以便在其之间限定一个计量体积,并且以便在非分配与分配位置之间移动期间,阀杆依序:(i)使气雾剂配制品自由流动到腔室中,(ii)针对阀杆的外表面与腔室的内表面之间的加压气雾剂配制品,限定一个闭合计量体积,和(iii)使闭合计量体积在腔室内移动而不减少闭合计量体积的体积直到计量体积与一个出口通道连通,由此允许分配计量体积的加压气雾剂配制品。这一类型的一种阀门描述于美国专利第 5,772,085 号中。另外,鼻内递送本发明化合物是有效的。

[0145] 为了配制一种有效药物经鼻组合物,药物必须容易递送到鼻腔(标靶组织)的所有部分,在鼻腔中该药物履行其药理学功能。另外,药物应保持与标靶组织接触相对长的时间段。药物保持与标靶组织接触越久,药物必须能够抵抗鼻部通道中的起作用以从鼻中去除颗粒的那些力。认识到此类力(称为“粘液纤毛清除”)极其有效地以一种快速方式(例如在从颗粒进入鼻中的时间起的 10-30 分钟内)从鼻中去除颗粒。

[0146] 一种经鼻组合物的其他所希望的特征在于,它必须不含有致使使用者不适的成分,它具有令人满意的稳定性和存放期性质,并且它不包括被认为对环境有害的成分(例如臭氧耗竭剂)。

[0147] 本发明的配制品当向鼻给予时的一种适合投药方案将使受试者在鼻腔被清洁之后深深地吸入。在吸入期间,将配制品施用到一个鼻孔,而手动压着另一个鼻孔。然后对另一个鼻孔重复这一程序。

[0148] 用于向鼻部通道施用本发明的配制品的一个构件是通过使用一个预压缩泵。举例来说,预压缩泵将是由瓦卢瓦 SA(Valois SA)制造的一个 VP7 型号。这种泵是有益的,因为它将确保配制品直到施加了充足力才被释放,否则的话更小剂量可以被施用。预压缩泵的另一种优势在于确保喷雾剂的雾化,因为它将直到达成了用于有效地雾化喷雾剂的阈值压力才释放配制品。典型地,VP7 型号可以与能够容纳 10-50ml 的一种配制品的一个瓶子一起使用。每次喷雾典型地将递送 50-100 μ l 的这种配制品,因此,VP7 型号能够提供至少 100 个计量剂量。

[0149] 通过使用一种适合的液化推进剂,用于通过吸入而局部递送到肺的喷雾组合物可以例如配制为水溶液或悬浮液或从加压包装(如一个计量剂量吸入器)递送的气雾剂。适用于吸入的气雾剂组合物可以是或者一种悬浮液或者一种溶液,并且通常含有具有式(I)的化合物,任选地与另一种治疗活性成分和一种适合推进剂组合,该推进剂如一种碳氟化合物或含氢氯氟碳化物或其混合物,具体来说氢氟烷烃,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷(尤其 1,1,1,2-四氟乙烷)、1,1,1,2,3,3,3-七氟-正丙烷或其混合物。二氧化碳或其他适合气体也可以用作推进剂。气雾剂组合物可以是不含赋形剂的,或可以任选地含有本领域中熟知的额外配制品赋形剂,如表面活性剂(例如油酸或卵磷脂)和共溶剂(例如乙醇)。加压配制品将通常留存于通过一个阀门(例如,一个计量阀)闭合的一个罐(例如,一个铝罐)中并且安装到配备有一个吹嘴的一个致动器中。

[0150] 用于通过吸入给药的药物合意地具有一个受控制的粒度。用于吸入到支气管系统

中的最优粒度通常是 1-10mm, 优选地 2-5mm。大小超过 20mm 的颗粒当被吸入时通常过大而无法到达小气管。为了达成这些粒度, 可以通过常规手段 (例如通过微粉化) 使如所产生的活性成分的颗粒大小减小。可以通过气流分级或筛分将所希望的部分分离出。适合地, 颗粒的形式将是结晶。当采用如乳糖的一种赋形剂时, 通常, 赋形剂的粒度将远大于本发明内的吸入药物。当赋形剂是乳糖时, 它典型地将以研磨乳糖形式存在, 其中不超过 85% 的乳糖颗粒将具有 60-90mm 的 MMD 并且不少于 15% 将具有小于 15mm 的 MMD。

[0151] 鼻内喷雾剂可以用水性或非水性媒剂, 添加如增稠剂、缓冲盐或酸或碱 (用以调节 pH)、等渗性调节剂或抗氧化剂的药剂来配制。

[0152] 用于通过喷雾吸入的溶液可以用一种水性媒剂, 添加如酸或碱、缓冲盐、等渗性调节剂或抗微生物剂的药剂来配制。它们可以通过过滤或在一个高压釜中加热而灭菌, 或以一种非无菌产物形式呈现。

[0153] 适于透皮给药的药物组合物可以按打算与受试者的表皮保持长时间段的紧密接触的离散贴片形式呈现。举例来说, 活性成分可以通过离子电渗疗法从贴片递送, 如通常描述于《药物研究》(Pharmaceutical Research), 3(6), 318(1986) 中。

[0154] 适于局部给药的药物组合物可以按软膏、乳膏、悬浮液、洗剂、散剂、溶液、糊剂、凝胶、喷雾剂、气雾剂或油剂形式配制。

[0155] 为了治疗外部组织, 例如口部和皮肤, 组合物可以按一种局部软膏或乳膏形式施用。当以一种软膏形式配制时, 本发明的化合物可以与或者一种石蜡或者一种水可混溶软膏基剂一起采用。可替代地, 本发明的化合物可以与一种水包油乳膏基剂或一种油包水基剂一起以一种乳膏形式配制。

[0156] 适于肠胃外给药的药物组合物包括可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使制品与既定接受者的血液等渗的溶质的水性和非水性无菌注射溶液; 和可以包括悬浮剂和增稠剂的水性和非水性无菌悬浮液。可以使组合物呈现于单位剂量或多剂量容器 (例如密封安瓿和小瓶) 中, 并且可以在一种冷冻干燥 (冻干) 条件下储存, 仅需要在使用之前即刻添加无菌液体载体 (例如水) 用于注射。可以由无菌散剂、颗粒剂以及片剂制备即用型注射溶液和悬浮液。

[0157] 本发明的化合物可以在一种肺损伤之前或之后向一个受试者给予。在一个实施例中, 本发明的化合物在一种肺损伤之后向一个受试者给予, 该肺损伤例如由以下各项诱导或引起的一种肺损伤: 炎症、自体免疫疾病 (如硬皮病和类风湿性关节炎)、急性肺损伤 (ALI)、急性呼吸窘迫综合症 (ARDS)、心脏先天缺陷、肺中有血块 (肺栓塞)、充血性心力衰竭、心脏瓣膜疾病、HIV 感染、血液长时间低氧水平、不同药物和物质滥用和 / 或阻塞性睡眠呼吸暂停。在一个实施例中, 本发明的化合物在由以下各项诱导或引起的一种肺损伤之后向一个受试者给予: 炎症、自体免疫疾病 (如硬皮病和类风湿性关节炎)、ALI 和 / 或 ARDS。在一个实施例中, 本发明的化合物在由能够导致肺损伤的药物和其他物质诱导或引起的一种肺损伤之后向一个受试者给予。

[0158] 本发明的方法和用途可以通过使用本领域中已知的技术和材料来执行。举例来说, 本发明的方法和用途可以用描述于格布雷马利亚姆 Y. T. (Ghebremariam Y. T.) 等人, 《公共科学图书馆·综合》(PLoS One) 8:e60653(2013), 考恩 K. N. (Cowan K. N.) 等人, 《自然·医学》(Nat Med) 6:698-702(2000), 以及佐久间 F. (Sakuma F.) 等人, 《肺》

(Lung) 177:77-88(1999) 中的技术和材料执行。用于评定或评估本发明的化合物的额外技术和材料是本领域中已知的。举例来说,本发明的化合物可以通过测量一个受试者对化合物的应答来评定或评估。在一个实例中,本发明的化合物可以通过测量一个受试者中的一种物质(例如,一种蛋白质、一种肽、一种趋化因子、一种 DNA、一种 RNA、一种 mRNA、一种基因、一种代谢物以及一种细胞)的量或浓度来评定或评估,受试者中的其量或浓度例如通过 FXR 信号传导途径而受本发明的化合物影响(例如,增加、上调、升高、降低、下调以及减少)。在一个实例中,本发明的化合物可以通过测量移动到受试者的肺的白细胞和/或纤维细胞的量来评定或评估。在另一个实例中,本发明的化合物可以通过测量受试者中(例如,受试者的肺中)的一种蛋白质、一种肽或一种趋化因子(例如,胶原蛋白、CXCL12、二甲基精氨酸二甲氨基水解酶(DDAH)以及 ω -N^o, N^o-不对称二甲基精氨酸(ADMA))的量或浓度来评定或评估。在另一个实例中,本发明的化合物可以通过测量炎症、内皮增生或 NO 信号传导中所涉及的一种基因(例如,一种促炎性因子(例如,IL-6 和 MCP-1)、一种内皮增生性因子(例如,VEGF 和 ACE2)、GC1a3、GC1b3、PKG1 或 PDE5)的量或浓度来评定或评估。

等效物

[0159] 本领域的普通技术人员顶多使用常规实验即可识别出或能够确定在此所述的特定实施例和方法的许多等效物。此类等效物打算由本发明的范围涵盖。

[0160] 在此引用的所有专利、专利申请以及文献参考都特此明确通过引用而结合。

[0161] 以下实例是示意性的并且不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

实例

实例 1. 制备化合物 1

[0162] a) 制备 3 α -羟基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯(III)。将 17.0kg 的 3 α -羟基-7-酮基-5 β -胆烷酸、68kg 的甲醇以及 0.17kg 的甲磺酸装入一个反应器中。然后将反应混合物加热到 30°C -60°C 后持续 1 小时,并且添加 25.5kg 的脱矿质水。然后将获得的混合物搅拌,冷却到 20°C -25°C 直到获得一个良好沉淀,然后进一步冷却到 0-15°C。将沉淀物过滤,并且用水和甲醇的一种混合物洗涤,并且进一步在一个烘箱中在约 40°C 下干燥。因此获得 15kg 的 3 α -羟基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯(III)。化学计量产率是 85.2%。

[0163] b) 制备 3 α -三甲基硅烷氧基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯(IV)。将 5.0kg 的 3 α -羟基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯、45kg 的甲苯、7.5kg 的三乙胺以及 7.5kg 的三甲基氯硅烷装入一个反应器中。将混合物加热到 70°C -80°C,并且保持在搅拌下在那个温度下约 1 小时,然后添加 37.5kg 的水,并且将混合物在 15°C -20°C 下搅拌。然后将下部水相分离并且排除。将有机相浓缩直到获得一种油性残余物,向其中添加 15kg 四氢呋喃。将由此获得的含有 3 α -三甲基硅烷氧基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯(IV)的溶液用于随后的阶段(c)中。

[0164] c) 制备 3 α , 7 α -二-三甲基硅烷氧基-5 β -胆烷酸甲酯(V)。将 30kg 的四氢呋喃装在一个反应器中,然后使混合物达到 -90° 与 -60°C 之间的一个温度。添加 9.8kg 的 100% 二异丙基氨基锂和 9.3kg 的三甲基氯硅烷,并且倾注在(b)中制备并且含有 3 α -三甲基硅烷氧基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯的完整四氢呋喃溶液。然后将混合物在 -60°C 与 -90°C 之间的一个温度下搅拌约 1 小时。然后倾注 4.50kg 的碳酸氢钠和 60kg 的水的一个溶液,并且将混合物在 0-10°C 下搅拌,并且将下部水相分离并且排除。然后将下部相浓缩直到获得一种油性残余物,向其中添加 45.0kg 的二氯甲烷。将由此获得的 3 α , 7 α -二-三甲基

硅烷氧基-5 β -胆烷酸甲酯的溶液传送到下一阶段(d)。

[0165] d) 制备 3 α -羟基-6 β -亚乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯(VI)。将来自前一步骤的 3 α , 7 α -二-三甲基硅烷氧基-5 β -胆烷酸甲酯于二氯甲烷中的完整溶液装入一个反应器中, 并且冷却到 -90℃ 与 -60℃ 之间。然后添加 1.97kg 的乙醛和 5.5kg 的醚合三氟化硼。将反应混合物保持在搅拌下在以上温度下 2-4 小时, 之后将其加热到 30℃ -35℃ 并且保持在那个温度下约 2-4 小时。然后添加 60kg 的水。将获得的混合物搅拌, 并且将水相分离。将由此获得的含有 3 α -羟基-6 β -亚乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯的溶液用于下一步骤中。

[0166] e) 制备 3 α -羟基-6 β -亚乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸(VII)。将前一步骤中获得的 3 α -羟基-6 β -亚乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯于二氯甲烷中的溶液装入一个反应器中。然后将溶剂通过蒸馏去除直到获得一种油性残余物, 向其中添加 15kg 的甲醇。然后将反应混合物加热到 45℃ -50℃, 并且添加 7.5kg 的 30% 氢氧化钠, 并且将反应混合物保持在以上温度下约 1 小时。然后添加 30kg 的水, 接着是 45.0kg 的二氯甲烷和 7.5kg 的 85% 磷酸。将下部有机相分离并且接着排除水相。将溶剂通过蒸馏从有机相去除直到获得一种糊状残余物。添加约 37.5kg 的乙酸乙酯到残余物中, 并且将混合物加热到 65℃ -75℃, 然后冷却到 10℃ -35℃。将沉淀物获得, 过滤, 并且用乙酸乙酯洗涤, 并且干燥。获得 8.0kg 的 3 α -羟基-6 β -亚乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸, 针对 3 α -羟基-7-酮基-5 β -胆烷酸甲酯计算的化学计量产率是 51.8%。

[0167] f) 制备 3 α -羟基-6 β -乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸(IX)。将 8.0kg 的 3 α -羟基-6 β -亚乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸、48.0kg 的水、5.1kg 的 30% 氢氧化钠、0.80kg 的 5% 钯/碳装入一个反应器中。将反应混合物在 1 个与 3 个大气压之间的一个压力下氢化, 直到不再注意到氢气吸收。

[0168] g) 制备 3 α -羟基-6 α -乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸(IX)。在反应结束时, 将混合物加热到 95℃ -105℃, 并且保持在那个温度下几个小时, 以使 3 α -羟基-6 β -乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸(VIII) 转化为所希望的 3 α -羟基-6 α -乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸(IX) 的相对应的差向异构体。过滤悬浮液, 并且回收催化剂。添加 5.1kg 的 85% 磷酸、9.6kg 的乙酸乙酯到被过滤的溶液中, 并且将反应混合物加热到 40℃ 与 70℃ 之间的一个温度。将其冷却到 0 与 30℃ 之间的一个温度, 并且将沉淀物通过过滤回收。在用乙酸乙酯洗涤之后, 将沉淀物在一个烘箱中在 65℃ 下干燥。获得 5.0kg 的 3 α -羟基-6 α -乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸。化学计量产率: 62.2%。m. p. 185℃ -188℃。

[0169] h) 制备 3 α , 7 α -二羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷酸。将 5.0kg 的 3 α -羟基-6 α -乙基-7-酮基-5 β -胆烷酸、5.0kg 的水、2.50kg 的氢氧化钠装在一个反应器中。然后将混合物加热到 70℃ -105℃, 并且倾注硼氢化钠溶解于 2.50kg 的水中的一种混合物, 然后将混合物保持温热 1 小时, 冷却到室温, 并且添加 10.0kg 的脱矿质水、15.0kg 的二氯甲烷以及 3.00kg 的 85% 磷酸。搅拌混合物, 分离下部有机相, 并且去除水相。通过冷却有机溶液获得粗产物的结晶。将这一产物溶解于 50kg 的脱矿质水和 1.10kg 的 30% 氨水中。然后将混合物搅拌直到获得一种完全溶液。将混合物保持在 20℃ -50℃ 下, 并且倾注 1.50kg 的磷酸。将沉淀的混合物在 20℃ 与 50℃ 之间的一个温度下搅拌, 然后将沉淀物通过过滤回收, 用水洗涤, 并且干燥。4.50kg 的 3 α , 7 α -二-羟基-6 α -乙基-5 β -胆烷酸。化学计量产

率:89.6%。

实例 2. 制备化合物 2-4

[0170] 3 α -四氢吡喃基氧基-7-酮基-5 β -胆烷-24-酸(2A)。将二噁烷(12ml)中的3,4-二氢-2H-吡喃(1.74ml,19mmol)缓慢滴落到对甲苯磺酸(115mg,0.6ml)和6 α -乙基-7-酮基石胆酸(5.0g,12mmol)于二噁烷(55ml)中的一个溶液中。将反应混合物在室温下搅拌2小时。然后添加水(40ml),并且将混合物在真空下部分浓缩,并且用EtOAc(4次/25ml)萃取。将合并的有机洗脱份用盐水(1次/50ml)洗涤,经无水Na₂SO₄干燥,并且在真空下蒸发,得到6g的化合物2A。将粗衍生物不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0171] 3 α -四氢吡喃基氧基-6 α -乙基-7-酮基-24-降-5 β -胆烷-23-碘化物(3A)。在用一个300w钨灯辐照下,逐滴添加于CCl₄(75ml)中的碘(5g,20mmol)到2(5.5g,11mmol)和前导四乙酸盐(4.9g,11mmol)于CCl₄(200ml)中的一个溶液中。将反应混合物搅拌直到色彩持久(18h)。将混合物冷却并且在Celite®上过滤。将有机相用一个5%Na₂S₂O₃溶液、5%NaOH、盐水(15ml)洗涤,经无水Na₂SO₄干燥,并且在真空下蒸发。将残余物通过使用轻质石油/EtOAc 95/5的一种混合物作为流动相进行硅胶急骤色谱而纯化,得到4.6g的化合物3A(40%产率)。

[0172] 3 α -羟基-6 α -乙基-7-酮基-24-降-5 β -胆烷-23-碘化物(4A)。将化合物3A(2.2g,3.8mmol)在室温下在HC137%于THF(50ml)中的一个溶液中搅拌过夜。将反应混合物用NaHCO₃的一个饱和溶液(20ml)、H₂O(20ml)以及盐水(20ml)洗涤,经Na₂SO₄干燥,并且在真空下蒸发,得到1.4g的化合物4A(80%产率)。将粗衍生物不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0173] 3 α -叔丁基二甲基硅烷氧基-6 α -乙基-7-酮基-24-降-5 β -胆烷-23-碘化物(5A)。向4A(1.4g,2.8mmol)于CH₂Cl₂(30ml)中的一个溶液中添加叔丁基二甲基氯硅烷(496mg,3.22mmol)和咪唑(230mg,3.36mmol),并且将混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物用NaHCO₃的一个饱和溶液(30ml)、盐水(30ml)洗涤,并且经无水Na₂SO₄干燥。将有机相在真空下蒸发,得到1.5g的化合物5A(87%产率)。将粗衍生物不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0174] 3 α -叔丁基二甲基硅烷氧基-6 α -乙基-7-酮基-24-降-5 β -胆烷-23-醇(6A)。向5(1.2g,1.96mmol)于丙酮(12ml)中的一个溶液中添加Ag₂CO₃(1.1g,3.9mmol)。将反应混合物回流过夜,并且然后冷却到室温,在Celite®上过滤,用丙酮洗涤,并且将合并的有机相浓缩,得到1g的化合物6A。将粗衍生物不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0175] 3 α -叔丁基二甲基硅烷氧基-7 α -羟基-6 α -乙基-24-降-5 β -胆烷-23-醇(7A)。向6A(1g,1.96mmol)于THF(50ml)和H₂O(12.5ml)的一种混合物中的一个溶液中添加NaBH₄(740mg,19.6mmol),并且将混合物在室温下搅拌1小时30分钟。将反应溶液在真空下部分浓缩,并且用CHCl₃(3次/20ml)萃取。将合并的有机层用盐水(1次/50ml)洗涤,经无水Na₂SO₄干燥,并且在真空下蒸发。将粗残余物通过使用CH₂Cl₂:MeOH 99:1的一种混合物作为流动相进行硅胶急骤色谱而纯化,得到0.8g的7A(81%产率)。

[0176] 3 α -叔丁基二甲基硅烷氧基-7 α -羟基-6 α -乙基-24-降-5 β -胆烷-23-硫酸三乙铵盐(8A)。向在-3℃下冷却的7A(0.5g,0.99mmol)于THF(7ml)中的一个溶液中添加

加 Et_3N (0.3ml, 2.1mmol), 并且将所得混合物搅拌 10 分钟。添加 ClSO_3H (0.1ml, 1.5mmol), 并且将混合物在室温下搅拌过夜。然后添加水 (10ml), 并且将混合物用 CH_2Cl_2 (3 次 / 15ml) 萃取, 经酸酐 Na_2SO_4 干燥, 并且在真空下蒸发。将粗硫酸盐衍生物不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0177] $3\alpha, 7\alpha, 23$ -三羟基- 6α -乙基- 24 -降- 5β -胆烷- 23 -硫酸三乙铵盐 (化合物 4)。向 8A (0.5g, 0.77mmol) 于丙酮 (8ml) 中的一个溶液中添加 $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ (10mg, 0.05eq), 并且将混合物在室温下搅拌 3 小时。将反应混合物过滤, 在真空下浓缩, 并且通过中等压力 Lichroprep RP-8、使用一种 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 8/2 混合物作为流动相而纯化, 得到 0.115g 的 4, mp 118°C - 121°C。

[0178] $3\alpha, 7\alpha, 23$ -三羟基- 6α -乙基- 24 -降- 5β -胆烷- 23 -硫酸钠盐 (化合物 3)。向 8A (0.4g, 0.72mmol) 于丙酮 (4ml) 和 H_2O (0.08ml) 的一种混合物中的一个溶液中添加 $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ (10mg, 0.05eq), 并且将所得混合物在室温下搅拌 3 小时。将反应混合物经 Celite® 过滤, 并且在真空下浓缩。将所得残余物用 10% NaOH 的一个甲醇溶液处理 2 小时。将所得混合物在真空下浓缩, 并且使用 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (7:3) 的一种混合物作为流动相进行液体中等压力纯化, 得到 0.09g 的 3 (25% 产率)。

实例 3. 用化合物 1 进行 FXR 激活的方法改善鼠类博莱霉素诱导的模型中的肺纤维化。

[0179] 在 C57B1/6 野生型和 $\text{FXR}^{-/-}$ 小鼠 (雌性, 6-8 周大) 中诱导博莱霉素诱导的肺纤维化的鼠类模型。处理组包括:

WT 小鼠 : A : 生理盐水 (第 0 天) ; B : 博莱霉素 (第 0 天) ; C : 博莱霉素 (第 0 天) - 化合物 1 (也称为 6ECDCA) (5mg/kg, 每天一次)

$\text{FXR}^{-/-}$ 小鼠 : D : 生理盐水 (第 0 天) ; E : 博莱霉素 (第 0 天) ; F : 博莱霉素 (第 0 天) 化合物 1 (也称为 6ECDCA) (5mg/kg, 每天一次)。

[0180] 在 22 天之后, 将小鼠处死, 并且进行后续分析 : (1) 对肺切片进行 H 和 E 和天狼星红染色 ; (2) 通过 qRT-PCR 和 Sircol 胶原蛋白分析来定量进入肺中的胶原蛋白 I ; (3) 通过 qRT-PCR 进行 FXR、SHP 以及 CXCL12 mRNA 定量 ; 以及 (4) 通过对肺匀浆进行 ELISA 来进行 CXCL12 蛋白定量。

[0181] 不希望受理论所束缚, 据认为本发明的化合物通过以下各项激活 FXR 并且实现对肺纤维化的改善 : (1) 通过驻留的成纤维细胞减少胶原蛋白 I 产生 ; 和 (2) 通过驻留的成纤维细胞减少 CXCL12 产生, 并且接着减少到达损伤位点的循环纤维细胞的募集。

[0182] FXR 激活通过驻留的成纤维细胞减少胶原蛋白 I 和 CXCR12 的产生。具体来说, 在 24 小时时间段的饥饿之后, 将来自鼠类肺成纤维细胞细胞系 (ATCC 编号 CCL-206) 的细胞用或不用 $\text{TGF } \beta 1$ (10ng/ml) 和 6ECDCA (10 μM) 刺激 24 小时, 并且然后通过 qRT-PCR 分析 FXR、SHP 以及 Co1 I 基因表达。在 24 小时时间段的饥饿之后, 将来自鼠类肺成纤维细胞细胞系 (ATCC 编号 CCL-206) 的细胞用或不用 $\text{TNF } \alpha$ (10ng/ml) 和 6ECDCA (10 μM) 刺激 24 小时, 并且然后通过 qRT-PCR 分析 FXR、SHP 以及 CXCL12 基因表达。

[0183] 由 6ECDCA 诱导的 Co1 I 和 CXCL12 的下调是 FXR 介导的。在过夜时间段的饥饿之后, 将鼠类肺成纤维细胞细胞系 (ATCC 编号 CCL-206) 用或不用 $\text{TGF } \beta 1$ (10ng/ml) 和 6ECDCA (1 μM) 刺激 24 小时 (在通过 siRNA 阻断 FXR 和不这样的情况下), 并且然后通过 qRT-PCR 分析 FXR、SHP、 Co1 I 以及 CXCL12 基因表达。对应地通过 ELISA 和 Sircol 胶原蛋

白分析来分析上清液中的 CXCL12 和 Co1 I 分泌。

[0184] 由 6ECDCA 诱导的 Co1 I 和 CXCL12 的下调是 SHP 介导的。具体来说,用携带 HA-SHP 嵌合体的载体对肺成纤维细胞执行转染,以诱导一种 SHP 过度表达(对 HA-SHP 表达进行 WB 分析)。在基线和在用 TGF β 1 刺激之后分析 Co1 I 和 CXCL12 表达(通过 qRT-PCR)。基础上和在用 TGF β 1 刺激之后,SHF 过度表达足以下调 Co1 I 和 CXCL12 表达。

[0185] 在过夜时间段的饥饿之后,将鼠类肺成纤维细胞细胞系(ATCC 编号 CCL-206)用/不用 TGF β 1(10ng/ml)和 6ECDCA(1 μ M)刺激 24 小时(在通过 siRNA 阻断 SHP 和不这样的情况下),并且然后通过 qRT-PCR 分析 FXR、SHP、Co1 I 以及 CXCL12 基因表达。对应地通过 ELISA 和 Sircol 胶原蛋白分析来分析上清液中的 CXCL12 和 Co1 I 分泌。

[0186] 测量到 CXCL12 介导的循环纤维细胞在损伤位点的募集有所减少。通过 FACS 分析来测定进入具有博莱霉素诱导的肺纤维化的小鼠(经处理和未处理)的肺中的鼠类 CD45+/Co1 I+/CXCR+ 纤维细胞的量。

[0187] 如下执行人循环纤维细胞的分离:将 PBMC 从白细胞去除包中分离,然后在具有 20% FCS 的 DMEM 中培养 1 周。将纤维细胞通过免疫磁性负选择来纯化以耗尽 B 和 T 淋巴细胞以及单核细胞/巨噬细胞(Dynabead 法)。使纯化的纤维细胞返回到培养物中再持续 5 天,随后对纯度(CD45+/Co1 I+/CXCR4+ 细胞)和其在 SCID 小鼠中的输注进行 FACS 分析。

[0188] 具体来说,如下执行博莱霉素肺纤维化的诱导,6ECDCA 处理,以及进入肺中的人纤维细胞浸润的分析:

[0189] 通过在 SCID 小鼠中气管内注射博莱霉素来诱导肺纤维化:在 4 天之后,所有小鼠都接受 1×10^6 个纯化的人纤维细胞的尾静脉注射。组:A 生理盐水溶液;B 博莱霉素;C 博莱霉素 + 6ECDCA;D 博莱霉素 + 抗鼠类 CXCL12 抗体。在再 4 天之后,通过 FACS 分析来分析进入肺中的人 CD45+/Co1 I+/CXCR4+ 纤维细胞的量。

[0190] 其他分析:对肺切片进行 H 和 E 和天狼星红染色;通过 qRT-PCR 和 Sircol 胶原蛋白分析来定量进入肺中的胶原蛋白 I;通过 qRT-PCR 进行 FXR、SHP 以及 CXCL12mRNA 定量;通过对肺匀浆进行 ELISA 来进行 CXCL12 蛋白定量。

实例 4. 对 Dahl 盐敏感大鼠的 6ECDCA 研究

[0191] ADMA(ω -N $^{\circ}$, N $^{\circ}$ -不对称二甲基精氨酸)是内皮功能障碍的一个主要原因,它会导致斑块形成、进展以及破裂。参见寇克(Coke),《循环》(Circulation), 109(2004):1813-1819。许多疾病与升高的 ADMA 水平相关。这些疾病包括例如视网膜静脉闭塞病、早期常染色体显性多囊肾病、蛋白尿、继发性淀粉样变性和内皮功能障碍、儿童偶发性局灶节段性肾小球硬化、先兆子痫、慢性血栓栓塞肺高血压、无并发症的 1 型糖尿病、肺高血压、镰状细胞疾病、抑郁症、充血性心力衰竭、阿尔茨海默病(还报告降低的 ADMA 水平)、与心血管疾病相关的肾病、高胆固醇血症、高同型半胱氨酸血症、高血压、动脉粥样硬化以及中风。DDAH(二甲基精氨酸二甲氨基水解酶)通过使 ADMA 代谢而对血压和胰岛素抗性具有有益作用。DDAH 过度表达可以增加 NO 合成并且降低血压。H. 达尤卜(H. Dayoub)等人,《循环》108(24):3042-3047。DDAH 过度表达还可以增强胰岛素敏感性。赛多(Sydow)等人,《动脉硬化、血栓形成与血管生物学》(Arterioscler Throm Vase Biol.) 28(2008):692-697。ADMA 在盐敏感高血压中起一定作用。H. 松冈(H. Matsuoka)等人,《高血压》(Hypertension) 1997, 29:242-247。

[0192] 以下实验显示,6ECDCA 可以通过增加 DDAH 表达并且降低 ADMA 水平而在盐敏感高血压大鼠中增强胰岛素敏感性并且降低血压。

[0193] 用于盐敏感高血压的啮齿动物模型是一种 DSS (Dahl 盐敏感) 大鼠 (例如, Rapp)。DSS 大鼠 (8% NaCl 饮食) 展现某些特征, 包括例如白蛋白尿、主动脉和心脏肥大、心力衰竭伴肺充血、胰岛素抗性、高胰岛素血症、高甘油三酯血症以及高脂血症。具体来说, 用于研究的啮齿动物模型是来自哈兰实验室 (Harlan Laboratories) 的雄性 4 周大的 DSS 大鼠 (例如, SS/JrHsd)。DSS 大鼠的正常饮食是 0.49% NaCl, 并且高盐饮食是 8% NaCl (例如, 特克拉定制研究饮食 (Teklad Custom Research Diet))。将大鼠分成四个组 (在此称为 DSS 研究大鼠) :

组 1 : 正常盐饮食 (1% 甲基纤维素) (N = 6)

组 2 : 高盐饮食 (媒介剂 ; 1% MC) (N = 9)

组 3 : 高盐饮食 (6ECDCA 10mg/kg/ 天) (N = 6)

组 4 : 高盐饮食 (6ECDCA 30mg/kg/ 天) (N = 9)

[0194] 执行以下分析 : 血清和尿液和组织 (例如, 肝脏、肌肉以及肾脏) 中的 ADMA 和 NO 水平, 血压和心率, 空腹血糖和胰岛素 (HOMA-IR), ipGTT (IR 指数), 以及尿蛋白和肌酸酐。还可以执行额外研究, 如肾脏中的电解质 (Na⁺)、组织学分析和 TGF β 表达, 肝脏、骨骼肌和肾脏中的 DDAH 表达和活性, 以及肝脏、骨骼肌和肾脏中的 Akt 磷酸化水平。

[0195] 每天一次经口给予 6ECDCA 持续 6 周。在第 0 周和第 6 周进行血液和尿液收集, 并且通过本领域中已知的方法进行分析。在第 0、1、2、4 以及 6 周通过尾套装置进行血压测量, 该测量对有意识的模型进行并且是无创的。还经由导管获得血压, 这在模型被处死时进行。在第 5 周进行葡萄糖负荷测试。通过测量一个 24 小时尿液样品中的尿体积、蛋白质和肌酸酐来分析肾功能。使用马森 (Masson) 和三色染色进行组织学分析。使用 ipGTT 测试和 HOMA/IR 指数分析胰岛素抗性。检测血液浓度和尿排泄中的 ADMA 和 NO 水平 (图 1)。

[0196] 在 (1) 一种低盐模型、(2) 一种高盐 (HS) + 媒介剂、(3) 10mg/kg 的 HS+6ECDCA 以及 (4) 30mg/kg 的 HS+6ECDCA 的一个七周研究中, 6ECDCA 并不影响具有高盐饮食的大鼠的体重 (图 2)。

[0197] 先前已经报告, RAPP 模型中的高盐饮食导致死亡率。图 3 是一幅图, 指示 DSS 研究大鼠的存活率 (%) 对比时间 (周)。

[0198] 据示出高盐饮食提高血压, 并且 6ECDCA 处理并不影响心率血压或降低血压 (图 4 和 5)。

[0199] 已知高盐饲喂诱导心脏肥大、肺充血以及肾纤维化。30mg/kg 剂量下的 6ECDCA 减轻肺重量, 表明 6ECDCA 针对肺充血具有保护性 (图 6A-6C)。

[0200] 测量 DSS 大鼠中在葡萄糖耐量测试 (GTT) 期间随时间的空腹血糖浓度 (图 7)。图 7 是一幅图, 指示 DSS 研究大鼠中在 GTT 期间随时间 (min) 的空腹血糖浓度 (mg/dL)。值是以下各项的平均值 $\pm$ SEM : 对照 (n = 6) ; 媒介剂 (n = 7) ; 10mg/kg 的 6ECDCA (n = 5) ; 以及 30mg/kg 的 6ECDCA (n = 9)。

[0201] 测量 DSS 研究大鼠中在 GTT 期间随时间的空腹血浆胰岛素浓度 (图 8)。图 8 是一幅图, 指示 DSS 研究大鼠中在 GTT 期间随时间 (min) 的空腹血浆胰岛素浓度 (ng/mL)。值是以下各项的平均值 $\pm$ SEM : 对照 (n = 6) ; 媒介剂 (n = 7) ; 10mg/kg 的 6ECDCA (n = 5) ; 以及

30mg/kg 的 6ECDCA (n = 9)。

[0202] 在胰岛素敏感性的评估(胰岛素抗性指数)中,6ECDCA 逆转由一种高盐饮食诱导的胰岛素抗性。IR 指数是血浆葡萄糖浓度优于空腹值的平均提升乘以平均血浆胰岛素浓度的乘积(图 9)。图 9 是一幅直方图,使用胰岛素抗性(IR)指数指示 DSS 研究大鼠中的胰岛素敏感性。值是以下各项的平均值 $\pm$ SEM:对照(n = 6);媒介(n = 6);10mg/kg 的 6ECDCA (n = 5);以及 30mg/kg 的 6ECDCA (n = 9)。

[0203] 30mg/kg 剂量下的 6ECDCA 处理显示肾保护。6ECDCA 减少由高盐饮食诱导的白蛋白尿(图 10A-B)。

[0204] 6ECDCA 处理并不降低血清和尿液中的 ADMA 水平也不增加 NO 水平(图 11)。

[0205] 饲喂一种 8% NaCl (HS) 饮食的 DSS 大鼠通常显现出血压和死亡率增加、相关的心脏和肾脏肥大以及肺充血(如增加的器官重量所显现)。饲喂一种 HS 饮食的 DSS 大鼠还显现出胰岛素抗性。葡萄糖和胰岛素水平倾向于在 6ECDCA 处理动物中更低,并且 IR 指数在 6ECDCA 10mg/kg 和 30mg/kg 处理动物中与媒介相比对应地减小 38% 和 21%。6ECDCA 并不降低饲喂 HS 的 DSS 大鼠的血压。6ECDCA 对肾功能已经有益作用(白蛋白尿减少),并且还减少肺充血。这些作用与 ADMA 和 NO 水平的全身性变化无关。

实例 5. 用化合物 1 (也称为 OCA) 进行慢性处理在野百合碱诱导的肺高血压大鼠模型中的作用

[0206] MCT 诱导的肺高血压大鼠模型

[0207] 通过皮下注射溶解于 0.5N HCl 溶液中的 60mg/kg 野百合碱(MCT)(西格玛化学品(Sigma Chemicals),美国密苏里州圣路易斯(St. Louis, MO, USA))诱导肺高血压。简单来说,将称重 200 到 250g 之间的雄性史泊格-多利(SD)大鼠在 12 小时亮:12 小时暗循环下,自由获取食物和水地关养在气候控制的条件下。将 SD 大鼠随机分配到以下组:

- 1) SD 大鼠,保持未处理并且在 7 (n = 5) 或 28 (n = 5) 天之后被处死;
- 2) SD 大鼠,接受媒介 MCT 的单次皮下注射,在 7 天之后被处死 (n = 5);
- 3) SD 大鼠,接受媒介 MCT 的单次皮下注射,在 28 天之后被处死 (n = 10);
- 4) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg, n = 5] 的单次皮下注射,在 7 天之后被处死;
- 5) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg, n = 15] 的单次皮下注射,在 28 天之后被处死;
- 6) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg] 的单次皮下注射,并且即刻用 OCA (30mg/kg, 每天一次,一周 5 天,通过经口管饲, n = 5) 处理 7 天;
- 7) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg] 的单次皮下注射,并且即刻用 OCA (30mg/kg, 每天一次,一周 5 天,通过经口管饲, n = 10) 处理 28 天;
- 8) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg] 的单次皮下注射,并且即刻用他达拉非 (10mg/kg/天,于饮水中, n = 5) 处理 7 天;
- 9) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg] 的单次皮下注射,并且即刻用他达拉非 (10mg/kg/天,于饮水中, n = 10) 处理 28 天;
- 10) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg] 的单次皮下注射,并且即刻用媒介 OCA (通过经口管饲, n = 5) 处理 7 天;
- 11) SD 大鼠,接受 MCT [60mg/kg] 的单次皮下注射,并且即刻用媒介 OCA (通过经口管饲, n = 10) 处理 28 天。

[0208] 在研究时间段期间,将大鼠称重并且观察整体外观。将大鼠在 7 或 28 天之后通过颈脱位处死,并且将肺脏和心脏的样品收集并且处理用于后续分析。动物处置遵守意大利佛罗伦萨 (Florence, Italy) 的佛罗伦萨大学 (University of Florence) 的实验动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee), 根据意大利内阁法律 (Italian Ministerial Law) 编号 116/92 进行。

[0209] 在动物处死之后,对右心室 (RV)、左心室以及室间隔 (LV+S) 称重。将 RV 与 LV+S 比 $[RV/(LV+S)]$ 用作右心室肥大 (RVH) 的一个指数

[0210] 与对照组相比, MCT 在第 7 天诱导右心室肥大指数 (RVH) 的增加 (未示出), 在第 28 天达到统计显著性 (图 12)。用 OCA 处理在第 28 天完全归一化 RVH。在用他达拉非的 28 天处理之后观察到类似结果 (图 12)。

[0211] 通过测定壁厚 (WT) 评估肺血管重塑。将肺固定在 10% 缓冲福尔马林中并且包埋于石蜡中, 然后以 $5\mu\text{m}$ 的一个厚度切片, 并且用苏木精-曙红染色。由对动物分组不知情的两位病理学家独立地使用一种形态测定学图像分析系统检查十个肺动脉的结构完整性。测定 WT、血管直径 (ED)。 $WT(\%) = (2 \times WT/ED) \times 100\%$ 。使用一台显微数字摄像机以 $\times 20$ 的放大率捕获来自至少三个组织切片的肺小动脉 (25 到 $100\mu\text{m}$ 直径) 的多于 50 个图像, 并且使用一个图像分析程序 (Fiji-win32) 分析。沿着最短直径测量外径 (D) 和任一侧上的中间厚度 (M1 和 M2)。中间壁厚表达如下: $\text{壁厚}\% = [(M1+M2)/2/D] \times 100$ 。

[0212] 检查不同实验组中的中间壁厚 (图 13, 14)。与对照相比, MCT 或者在第 7 天 (图 13) 或者在第 28 天 (图 14) 诱导小肺动脉壁厚 (WT) 的显著增加 [在第 7 天: MCT 中的 $33\% \pm 0.8\%$ 对比对照中的 19 ± 0.7 , $p < 0.00001$; 在第 28 天: MCT 中的 $32.6\% \pm 0.7\%$ 对比对照中的 $16.8 \pm 0.8\%$, $p < 0.00001$]。OCA 处理在第 7 天和第 28 天两者都显著地减少 MCT 诱导的 WT 增加 (两者 $p < 0.00001$, 对应地图 13 和 14)。

[0213] 对炎症 [白细胞介素 6 (IL-6)、单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1/CCL2)、环加氧酶 -2]、内皮增生性因子 (血管内皮生长因子 (VEGF) 和血管收缩素转化酶 2 (ACE2))、NO 信号传导 [内皮氧化氮合成酶 (eNOS)、5 型磷酸二酯酶 (PDE5)、环鸟苷酸环化酶亚单位类型 1a3 和 1b3 (GC1a3、GC1b3)、蛋白激酶 G 1 (PKG1)] 中所涉及的基因进行 mRNA 表达分析。从肺分离 RNA, 根据荧光 TaqMan 方法进行 qRT-PCR。对前述靶基因和参考基因 18S rRNA 的 mRNA 序列具有特异性的 PCR 引物和探针购自生命技术 (Life Technologies) (英国佩斯利 (Paisley, UK))。

[0214] 在 MCT 处理之后第 7 和 28 天两者, MCP-1 的基因表达都显著增加。有趣地, OCA 处理在第 7 和 28 天两者都显著减少 MCT 诱导的 MCP-1 表达 (图 15)。类似地, 在第 28 天, OCA 显著减少 IL-6 mRNA 表达, 它因 MCT 投药而上调 (图 16)。

[0215] VEGF 和 ACE2 基因的表达在第 7 天在各组之中并不显著不同。相反地, 两者在第 28 天与对照组相比都显示出 MCT 组中的减少。OCA 处理能够显著上调 VEGF (图 17) 和 ACE2 (图 18) mRNA 表达两者 (对比相同时间点的 MCT, 对应地 $p = 0.001$ 和 $p = 0.038$)。

[0216] 在 7 天的 OCA 投药之后, 与 NO 信号传导相关的基因 (包括 GC1a3、PKG1 以及 PDE5) 存在显著增加 (图 19-21)。在第 28 天, 所有这些基因的表达存在显著减少 (对比相同时间点的对照, 全部 $p < 0.01$)。用 OCA 的 28 天处理显著上调 PKG1 mRNA 表达 (对比相同时间点的 MCT, $p = 0.01$; 图 19)。

[0217] 在研究时间段期间,每天一次观察动物的死亡率,并且用卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)分析来计算每个组中的中值存活时间。

[0218] 图 22 示出了未处理或经 MCT 处理的大鼠中的存活单变量分析。每天一次观察死亡率,并且在每个指示的时间点示出存活率。在处理开始时第 0 天的存活率是 100%。MCT 诱导存活的统计显著降低 ($p = 0.022$)。OCA 将死亡数量从 24%降低到 13.2%。尽管这一降低与 MCT 并不统计上不同,但它也与对照并无不同。

[0219] 对于如规定的 n 个实验,结果表示为平均值 $\pm$ S. E. M. (平均标准误差)。用一种单向 ANOVA 测试接着用图克-克拉默 (Tukey-Kramer) 事后分析来进行统计分析,以便评估各组之间的差异,并且将 $p < 0.05$ 视为显著。当数据非正态分布时,用克鲁斯卡尔-沃利斯 (Kruskal-Wallis) 测试来计算统计差异,并且将曼-惠特尼 (Mann-Whitney) U 测试用于在各组之间进行比较。使用斯皮尔曼法 (Spearman's method) 评估相关性,并且用社会科学统计包 (SPSS 公司,美国伊利诺伊州芝加哥 (Chicago, IL, USA)) 关于 Windows 20.0 进行统计分析。

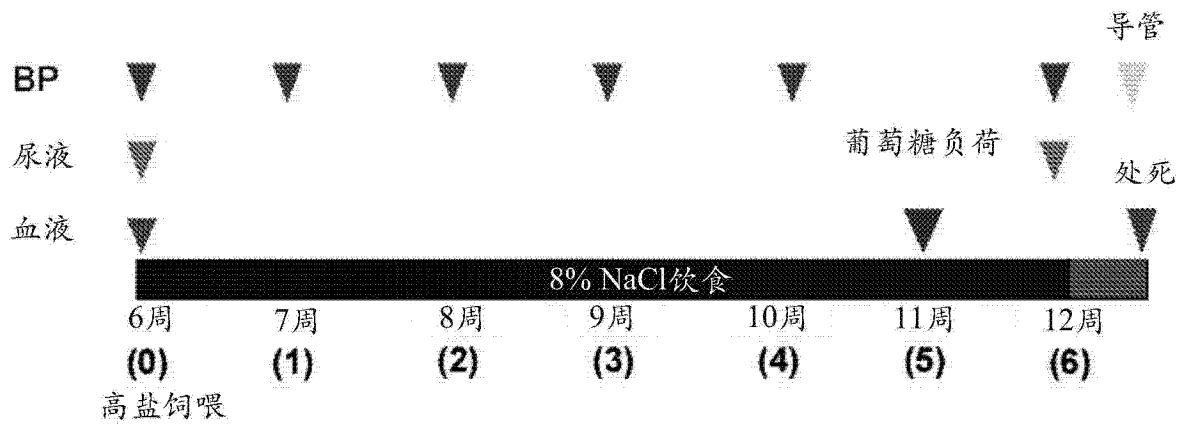


图 1

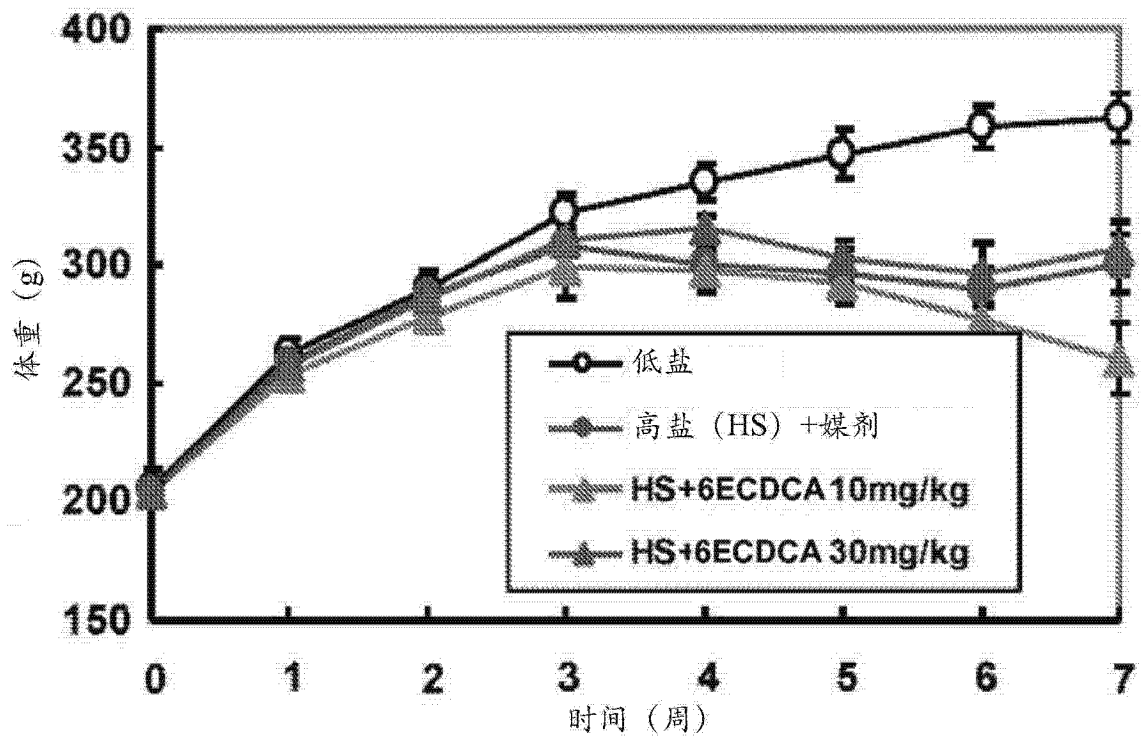


图 2

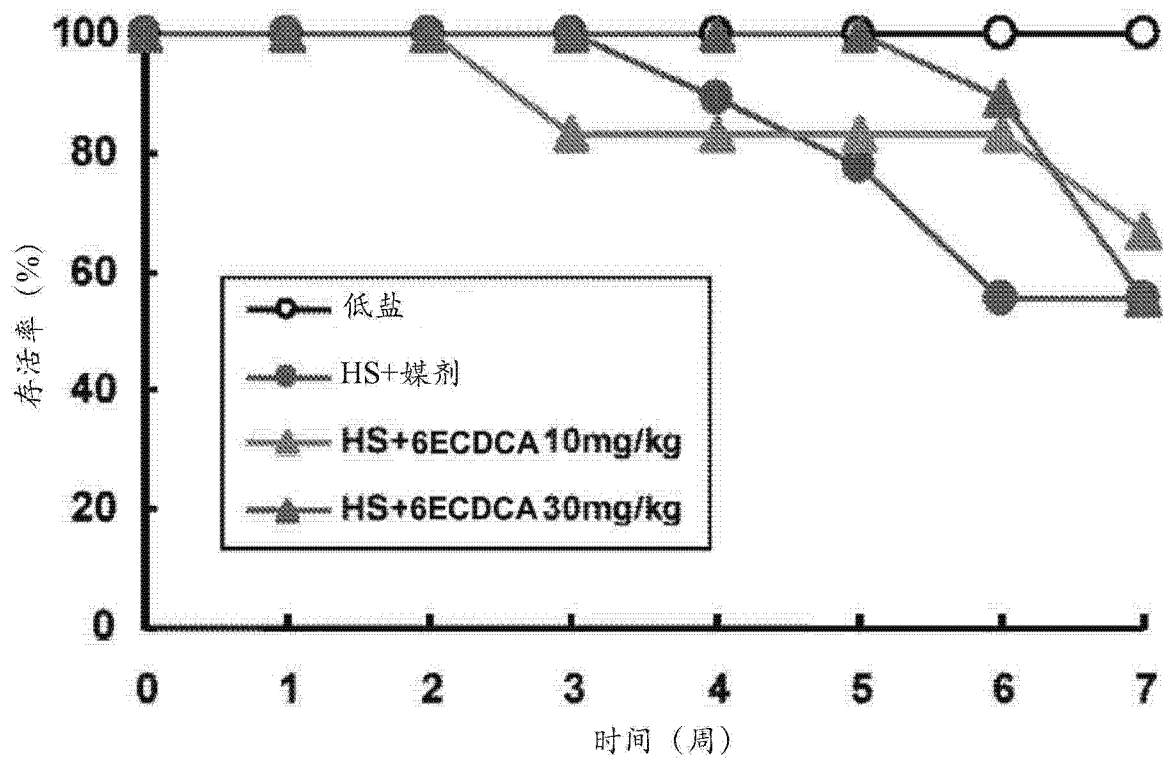


图 3

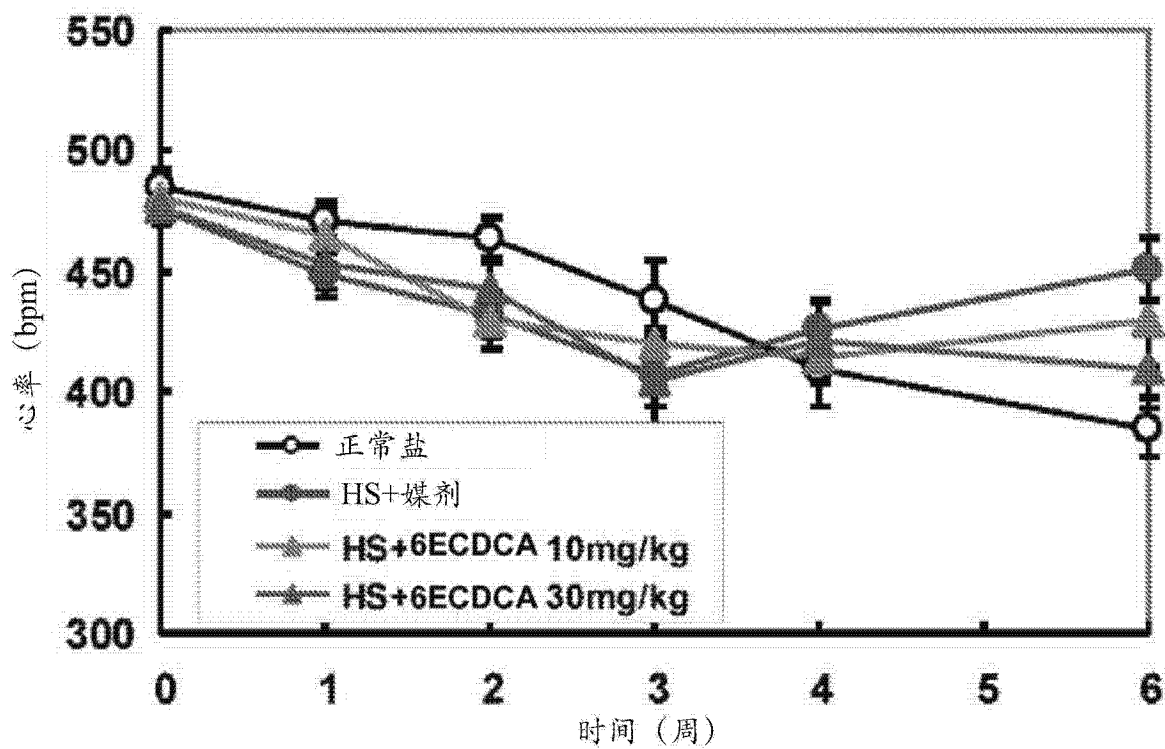


图 4

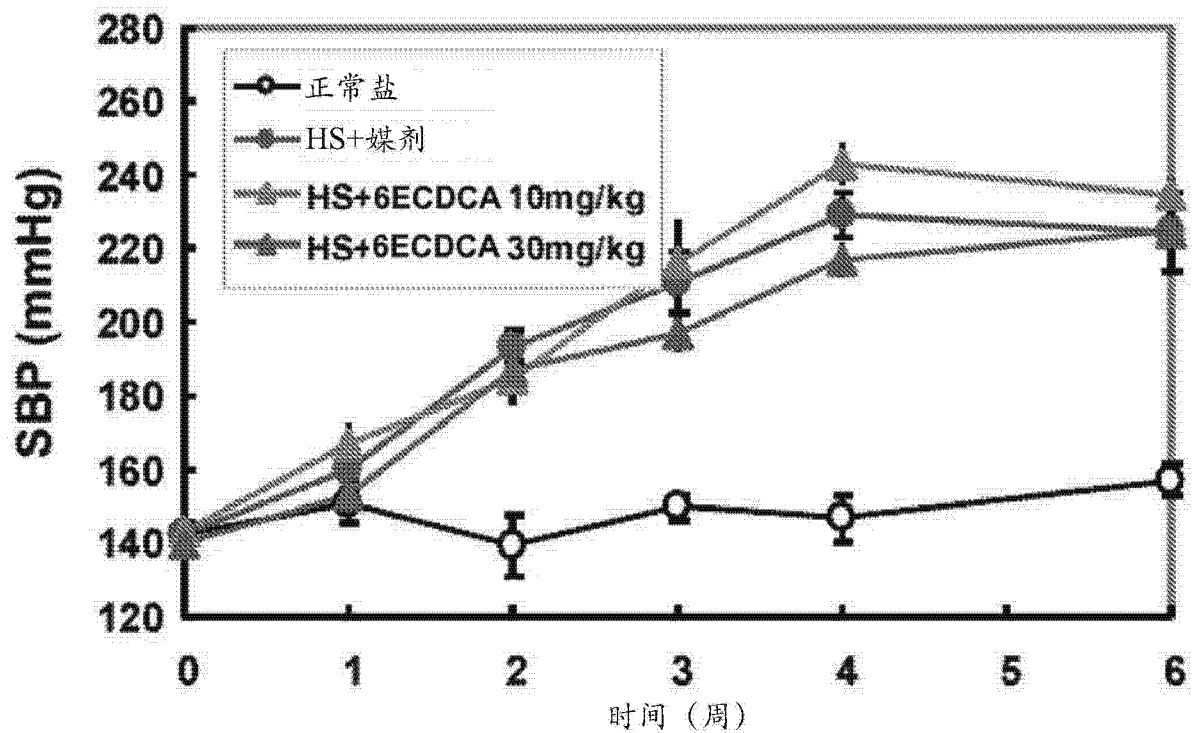


图 5

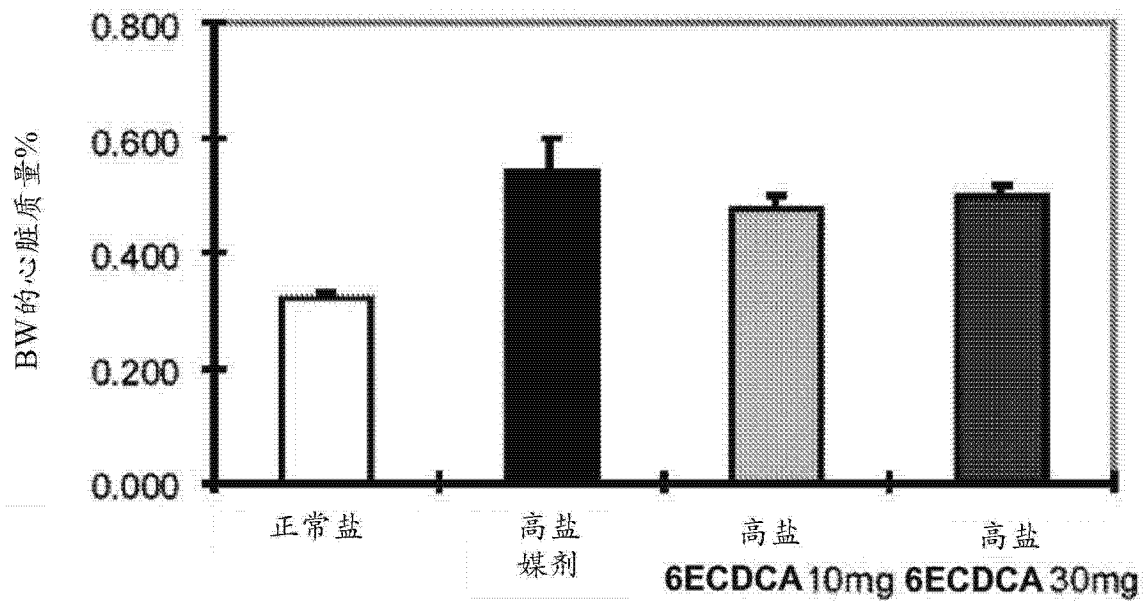


图 6A

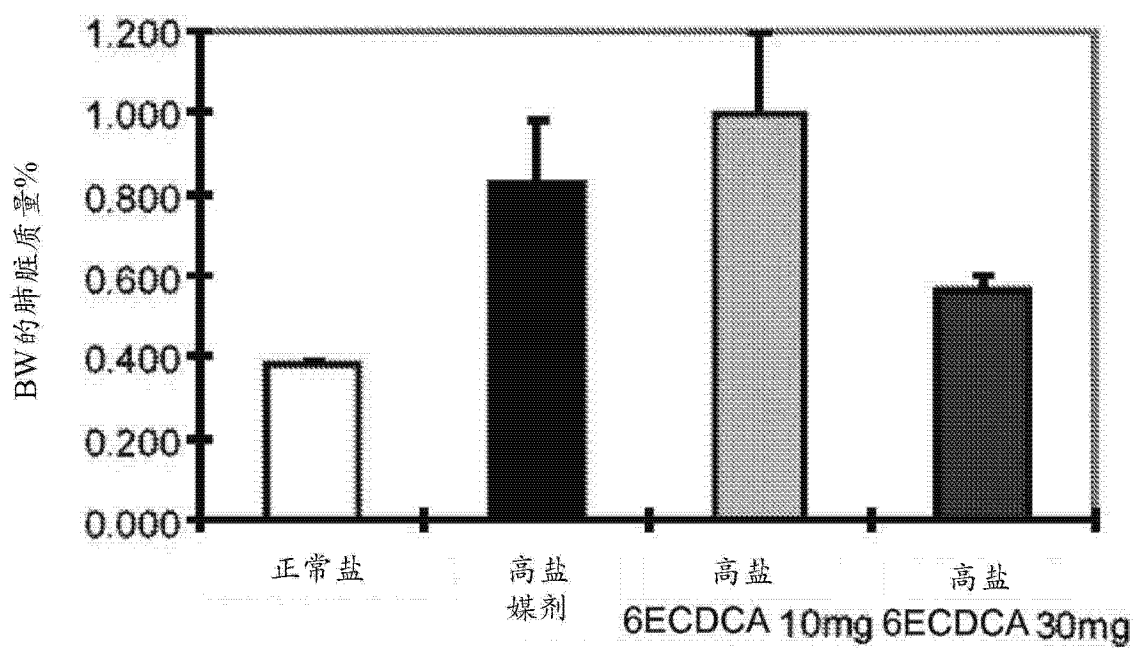


图 6B

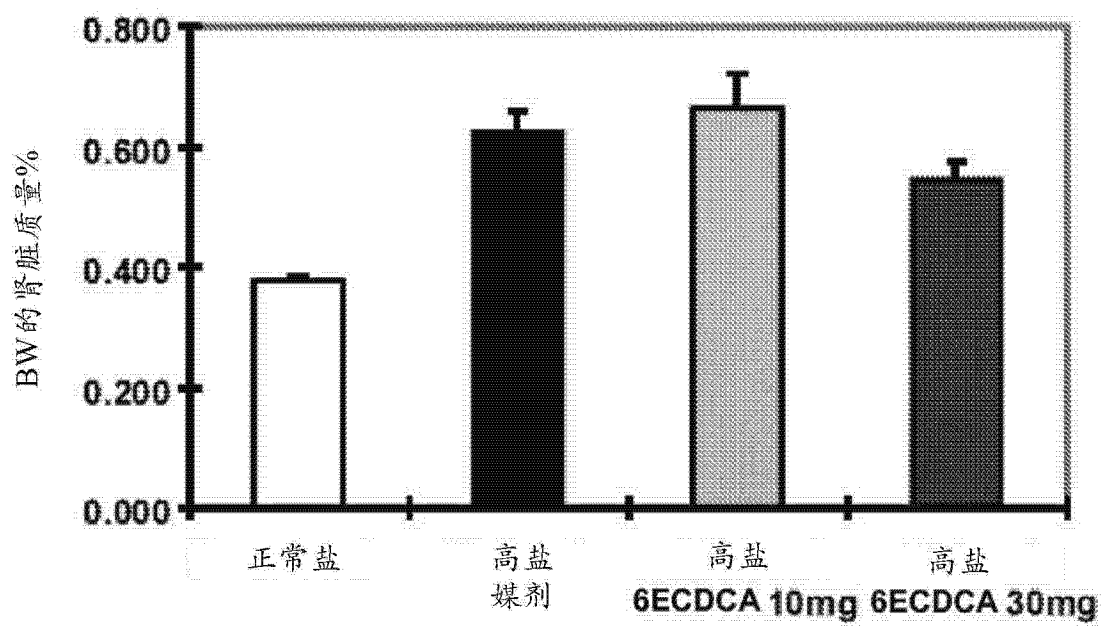


图 6C

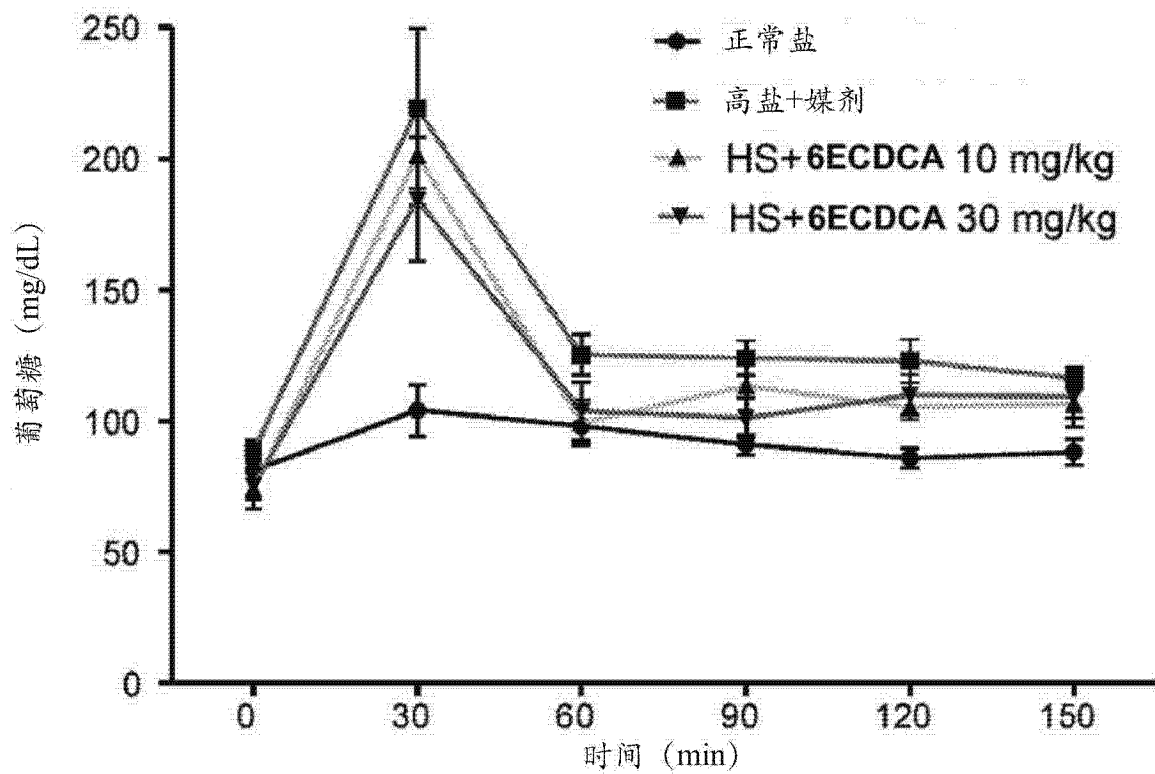


图 7

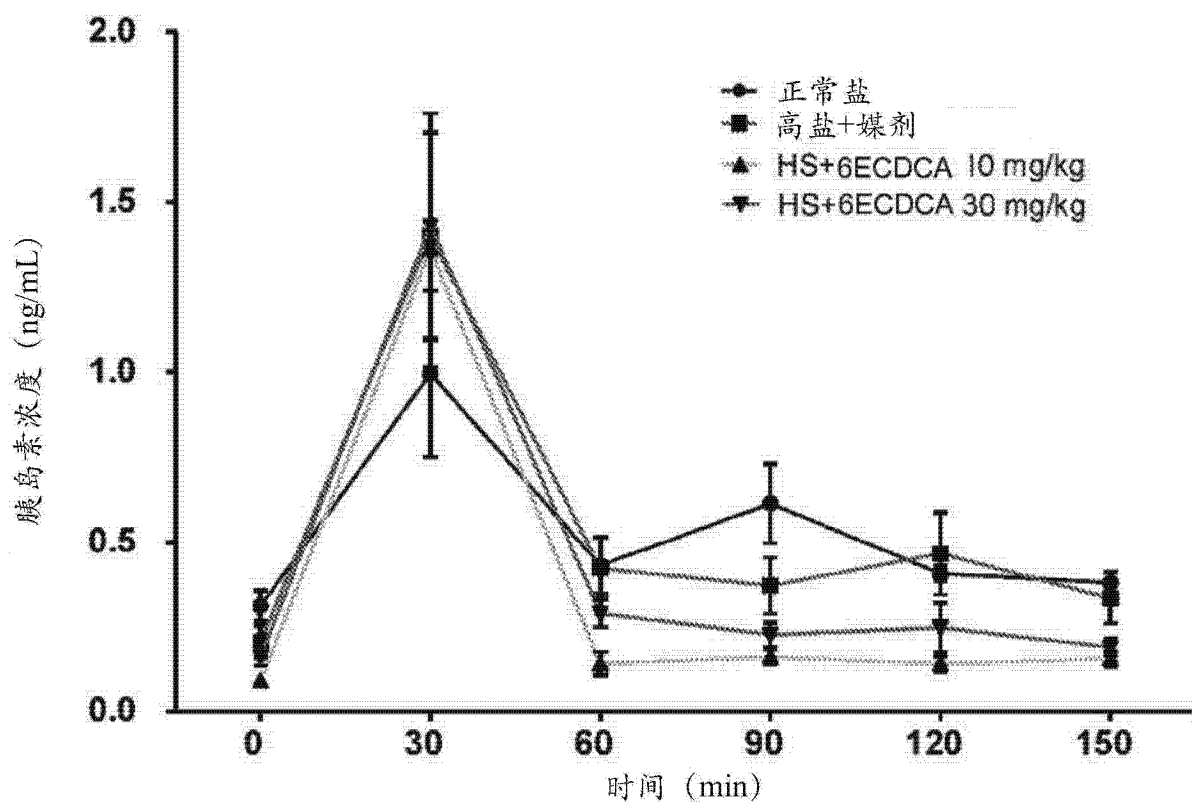


图 8

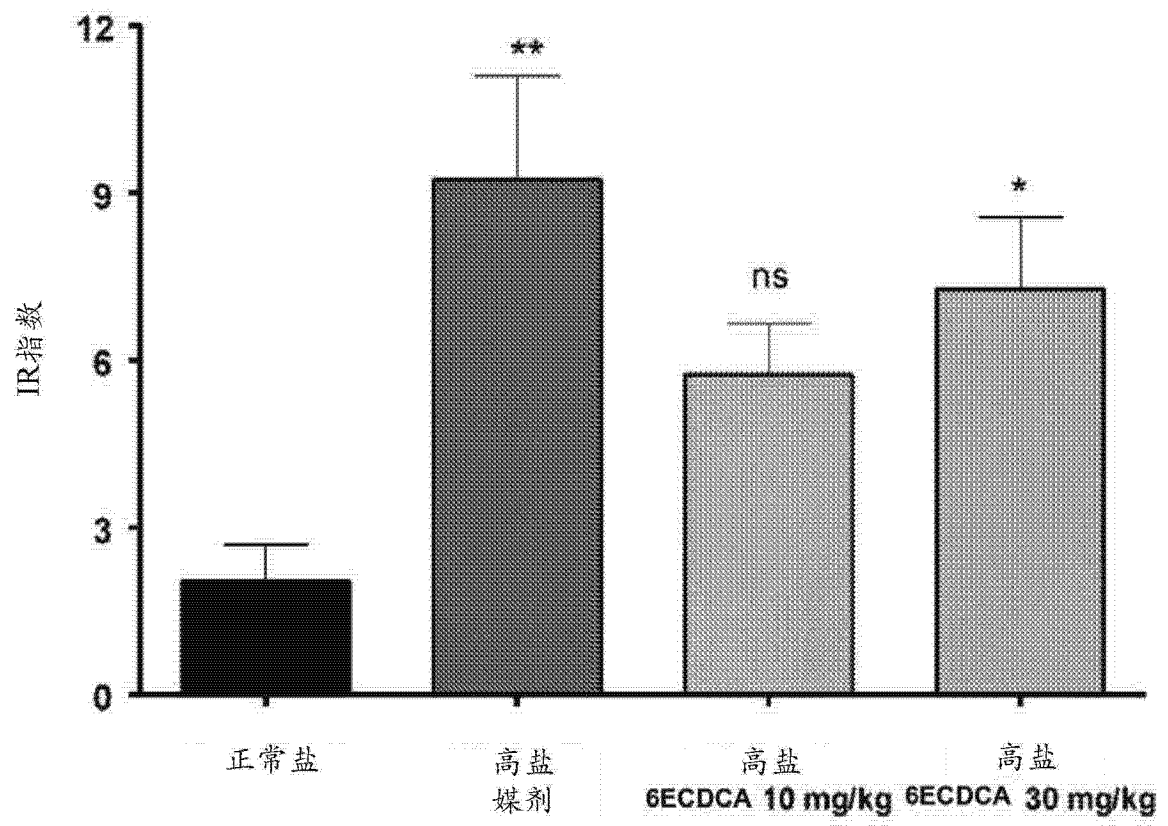


图 9

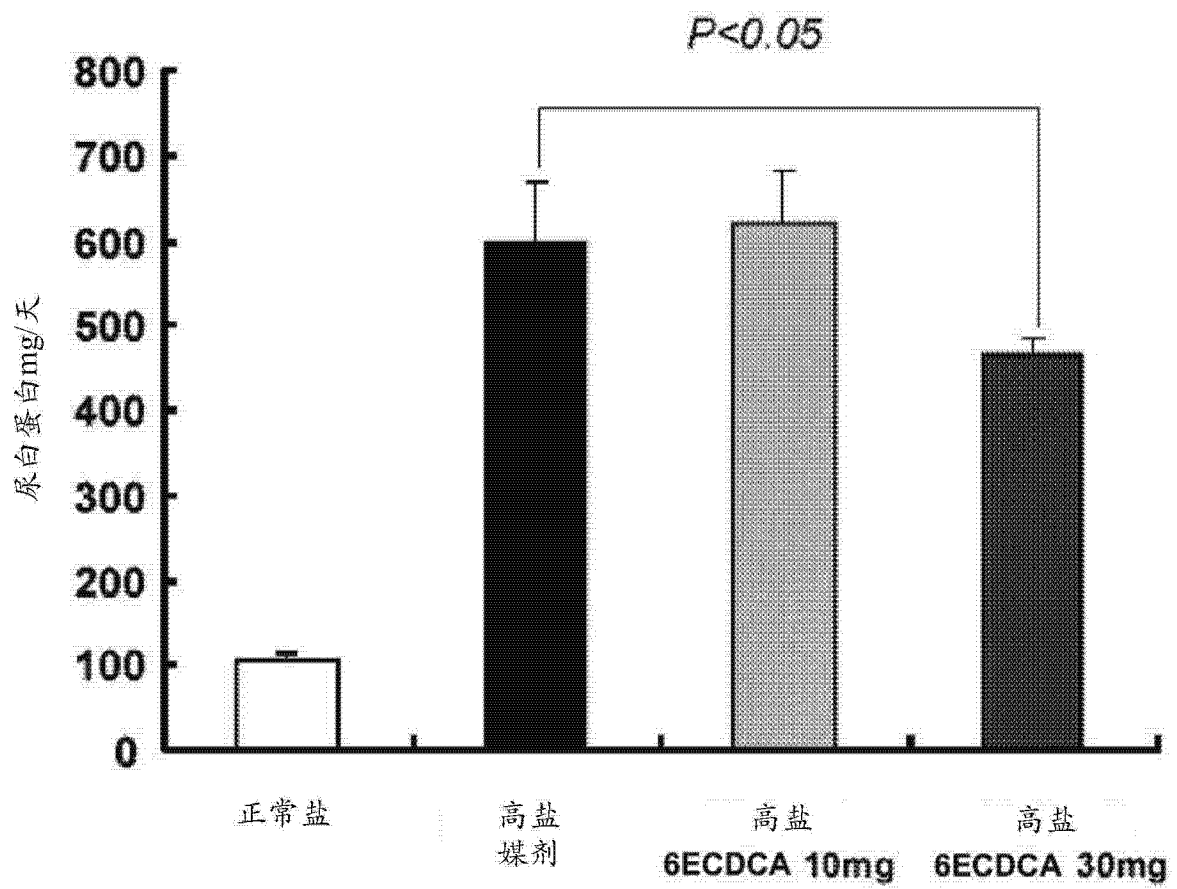


图 10A

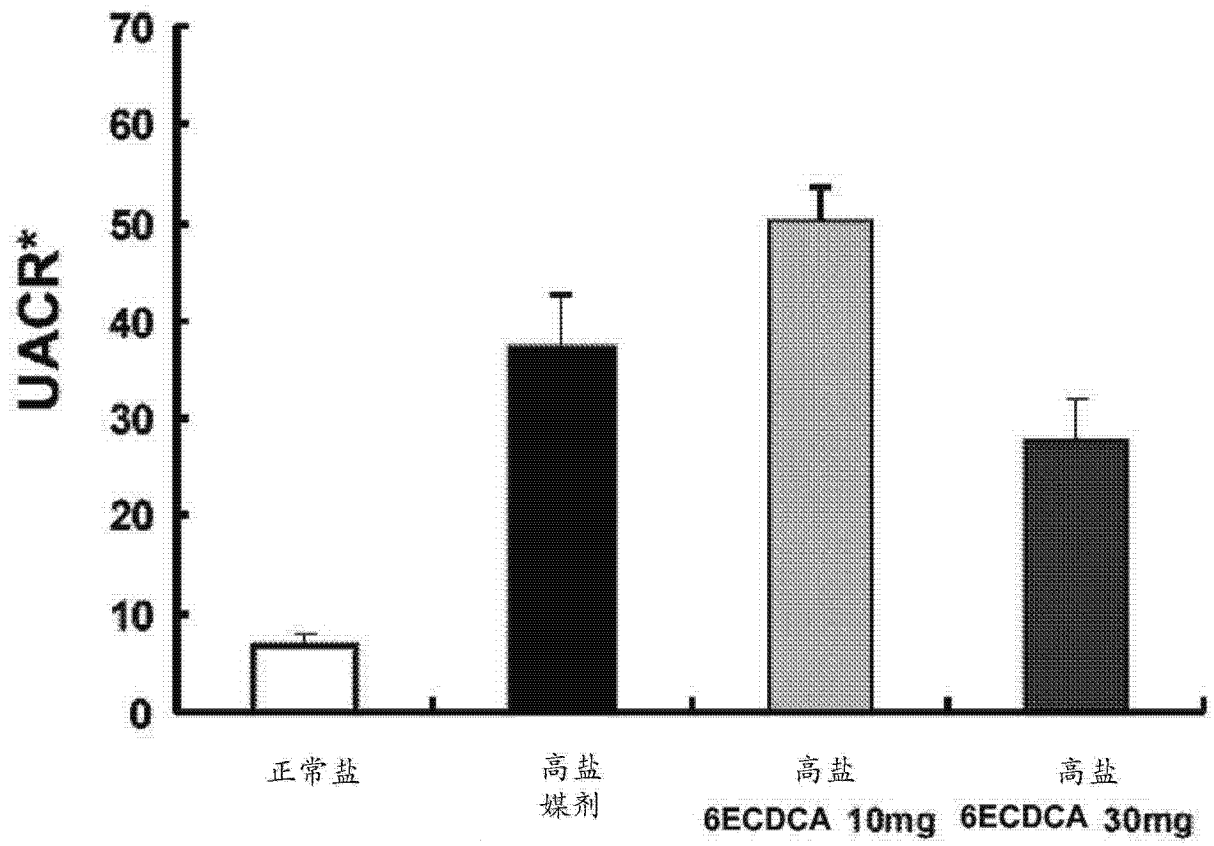


图 10B

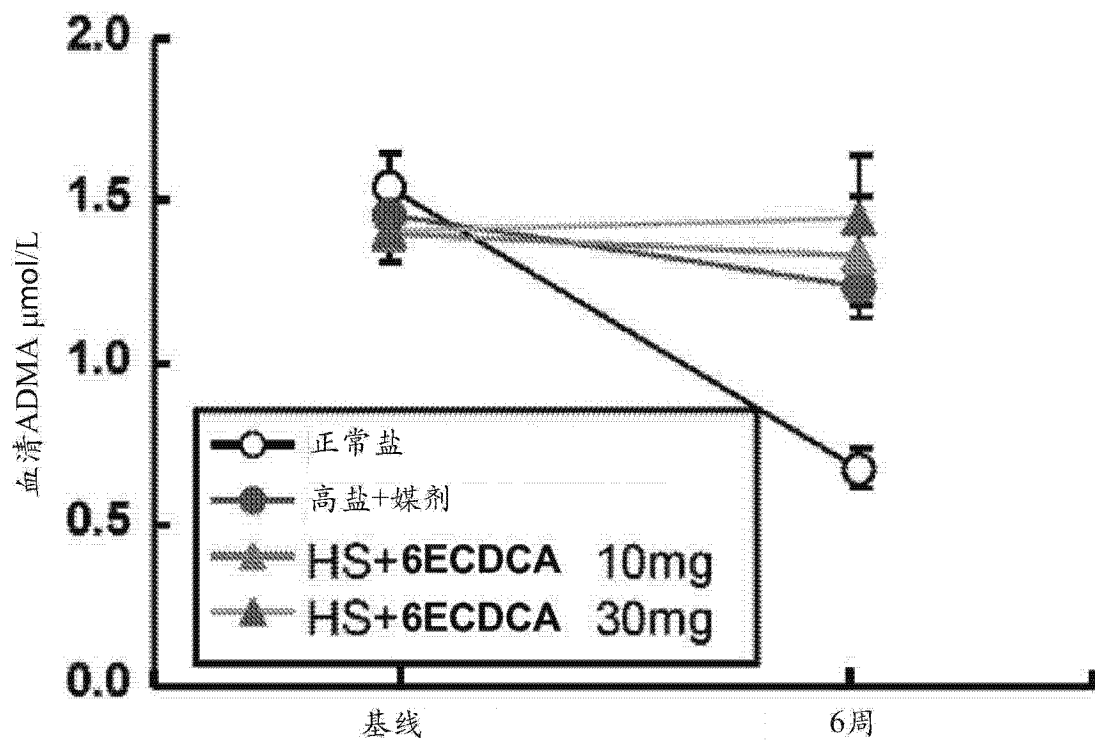


图 11A

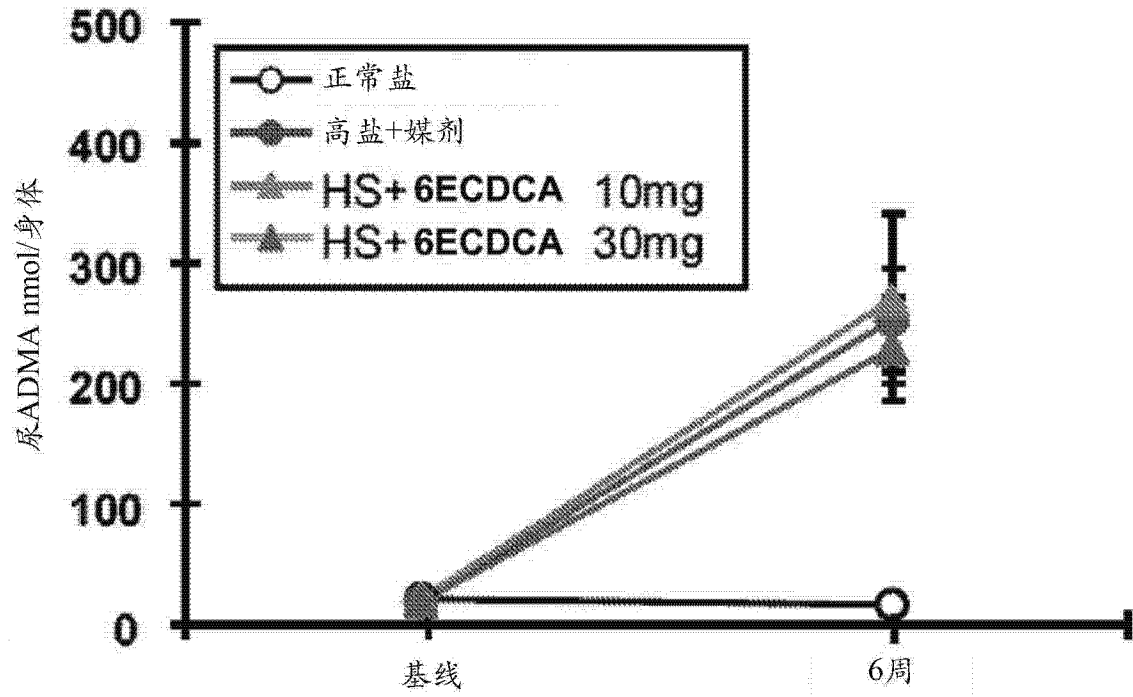


图 11B

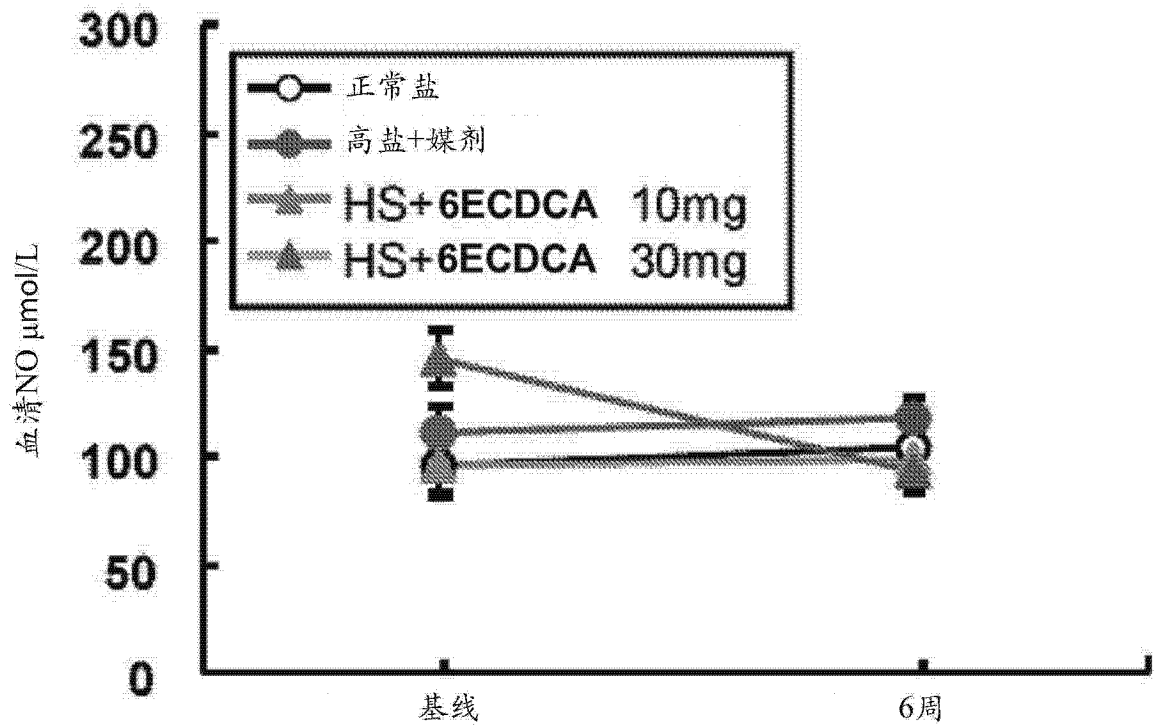


图 11C

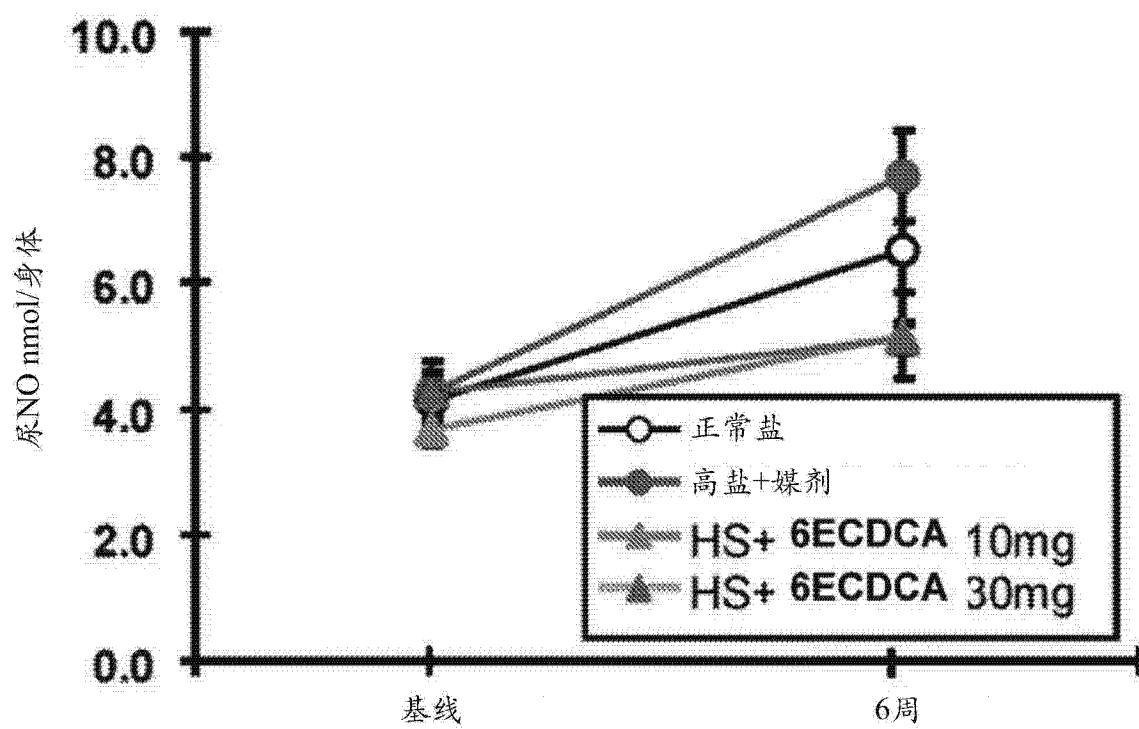
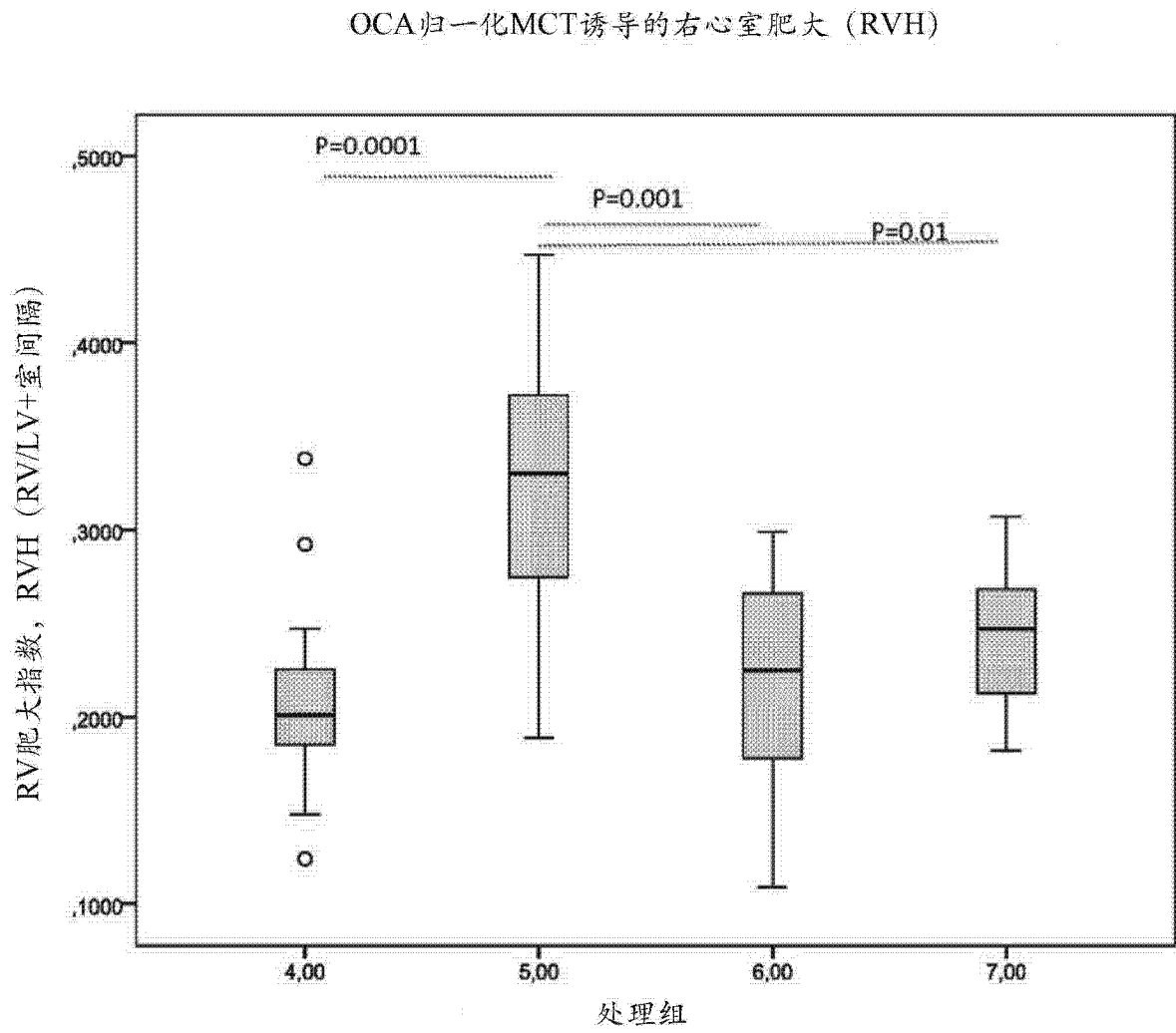


图 11D



4=第28天的对照

5=第28天的MCT

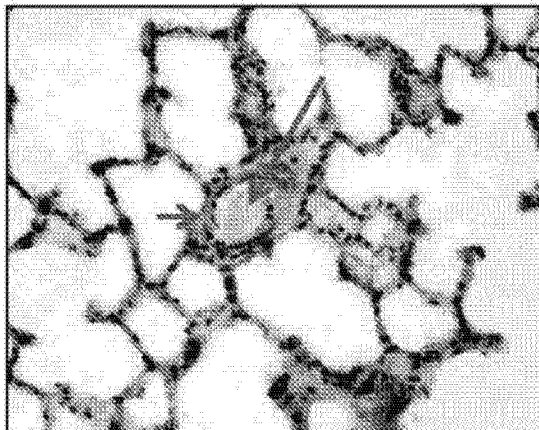
6=第28天的MCT+OCA

7=第28天的MCT+他达拉非

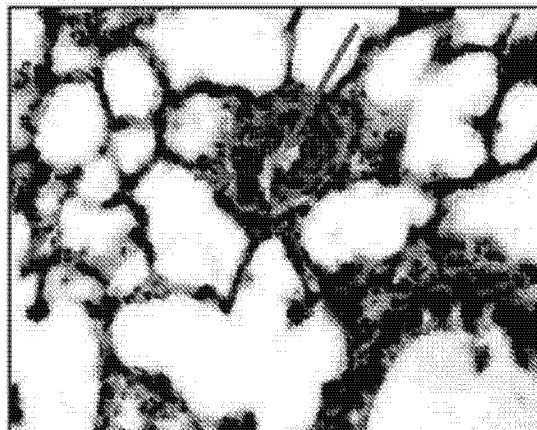
图 12

第7天的肺切片的苏木精-曙红染色

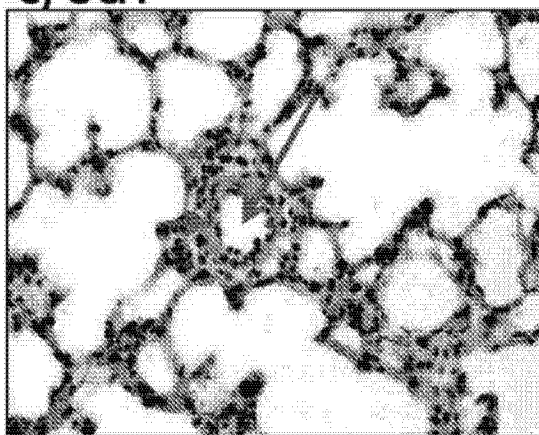
A) 对照



B) 野百合碱



C) OCA



D) 他达拉非

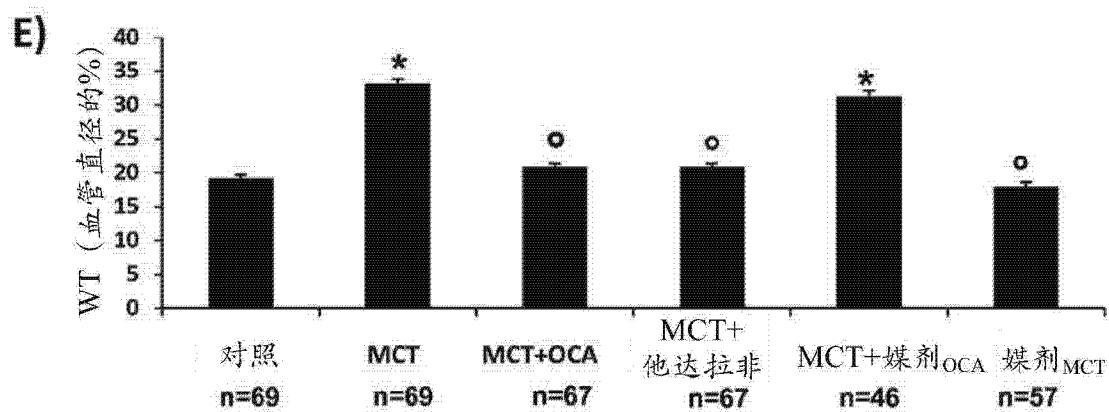
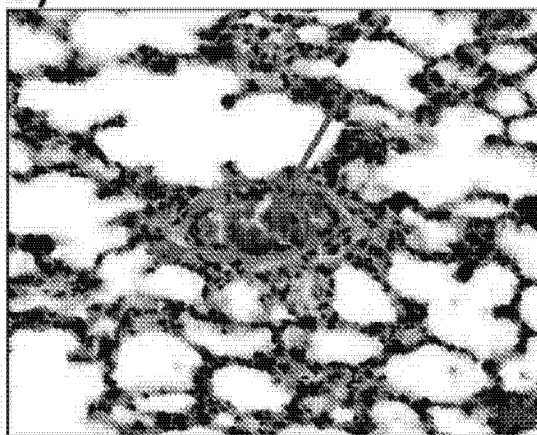


图 13

第28天的肺切片的苏木精-曙红染色

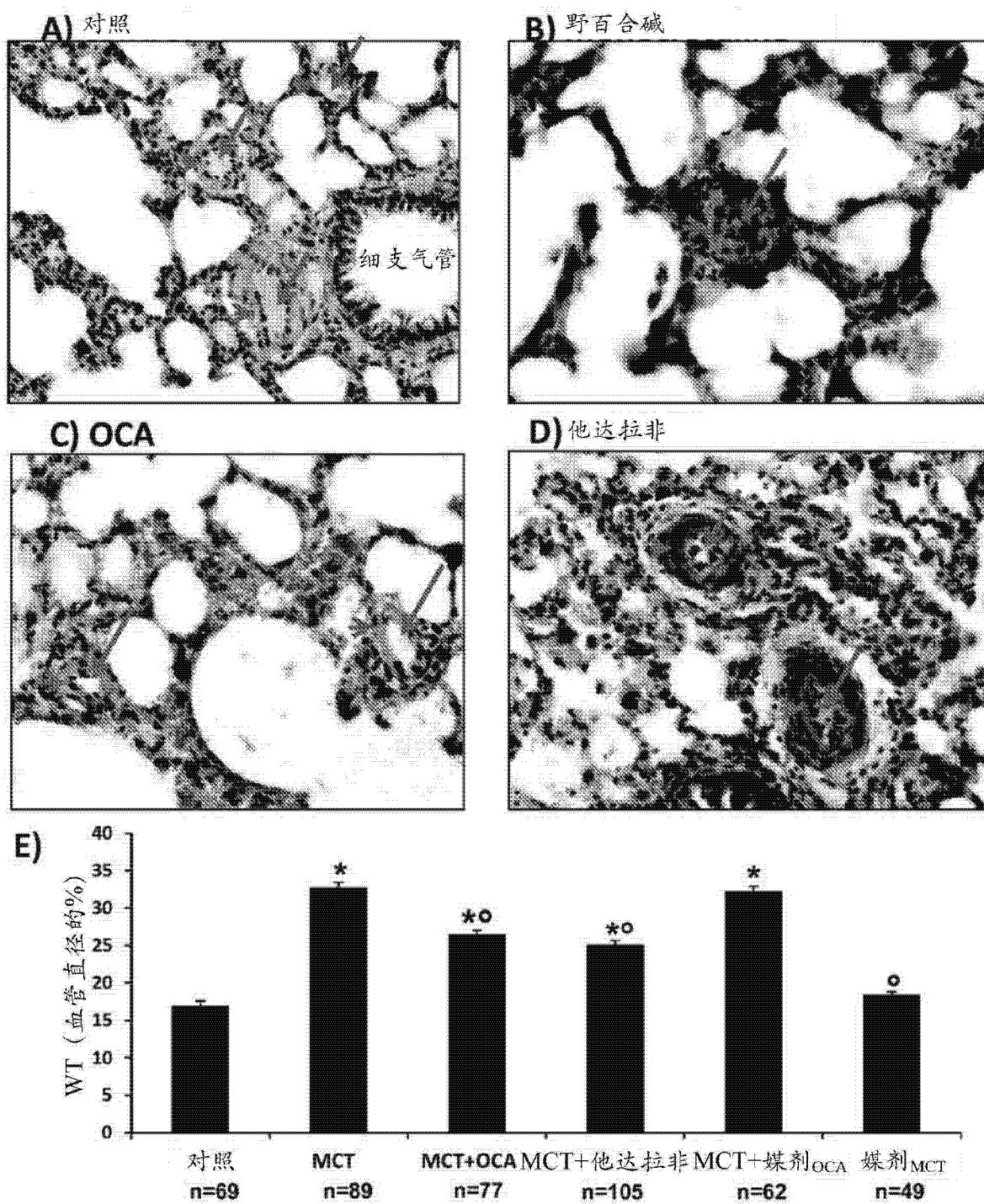
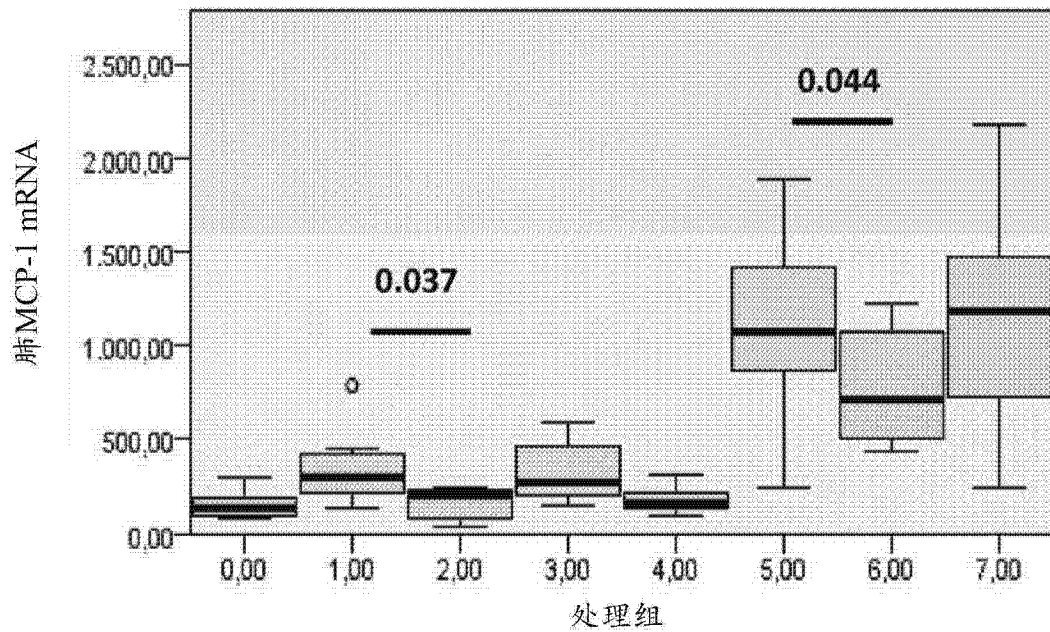


图 14

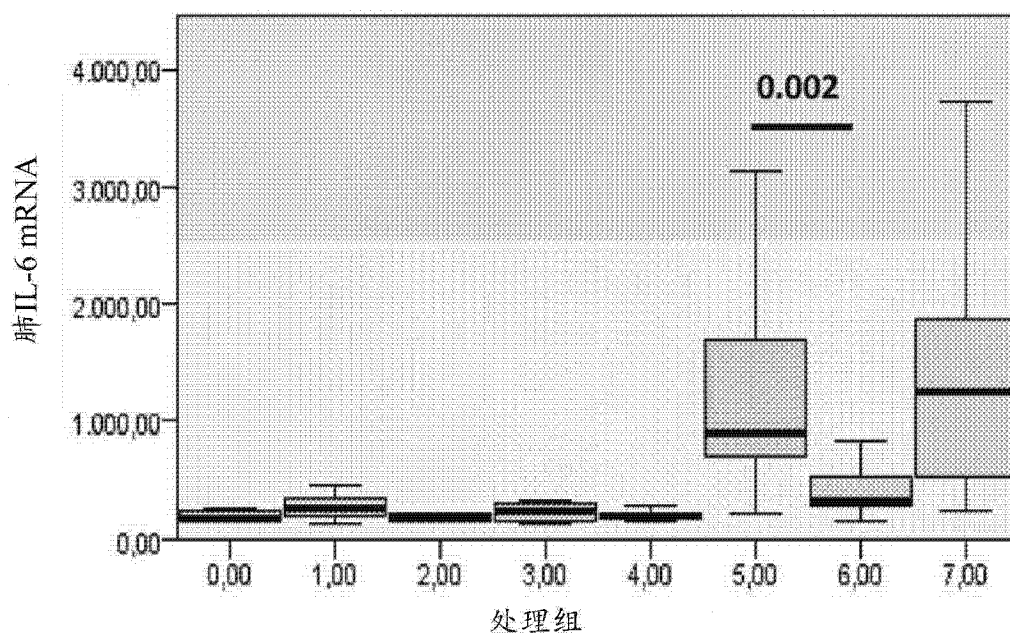
对肺MCP-1 mRNA的作用



0=第7天的对照
1=第7天的MCT
2=第7天的MCT+OCA
3=第7天的MCT+他达拉非
4=第28天的对照
5=第28天的MCT
6=第28天的MCT+OCA
7=第28天的MCT+他达拉非

图 15

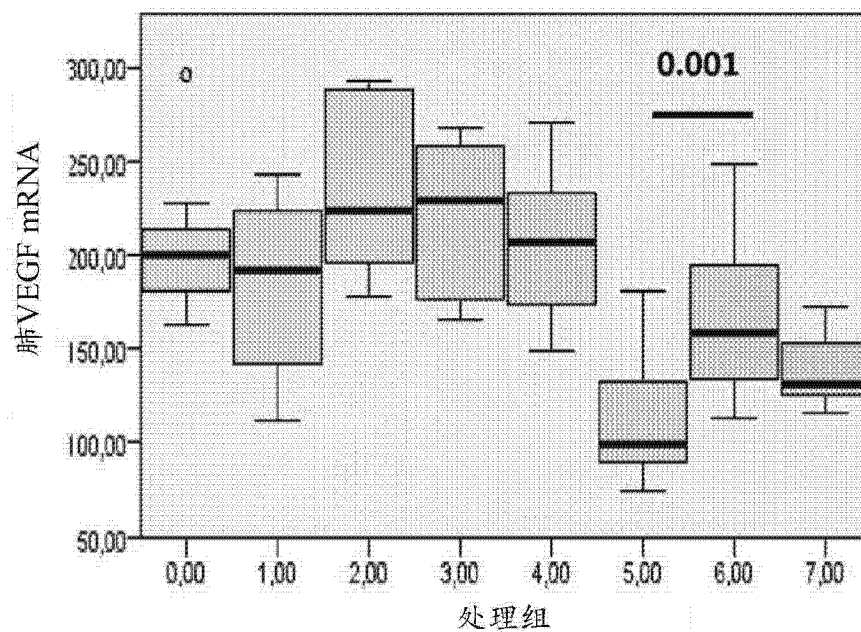
对肺IL-6 mRNA的作用



- 0=第7天的对照
- 1=第7天的MCT
- 2=第7天的MCT+OCA
- 3=第7天的MCT+他达拉非
- 4=第28天的对照
- 5=第28天的MCT
- 6=第28天的MCT+OCA
- 7=第28天的MCT+他达拉非

图 16

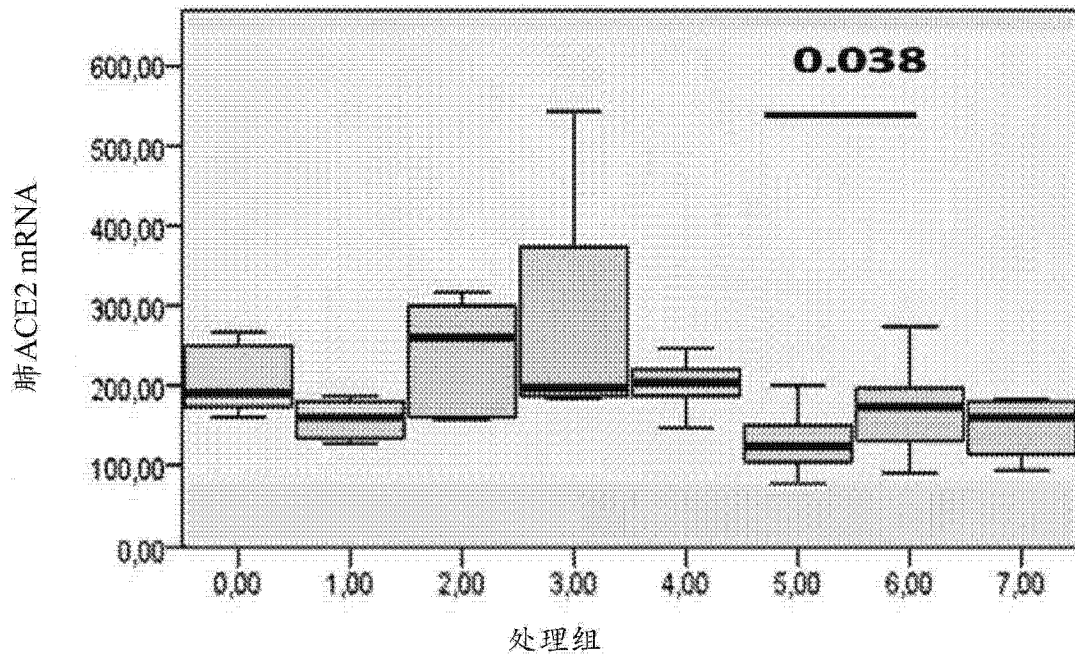
对肺VEGF mRNA的作用



- 0=第7天的对照
- 1=第7天的MCT
- 2=第7天的MCT+OCA
- 3=第7天的MCT+他达拉非
- 4=第28天的对照
- 5=第28天的MCT
- 6=第28天的MCT+OCA
- 7=第28天的MCT+他达拉非

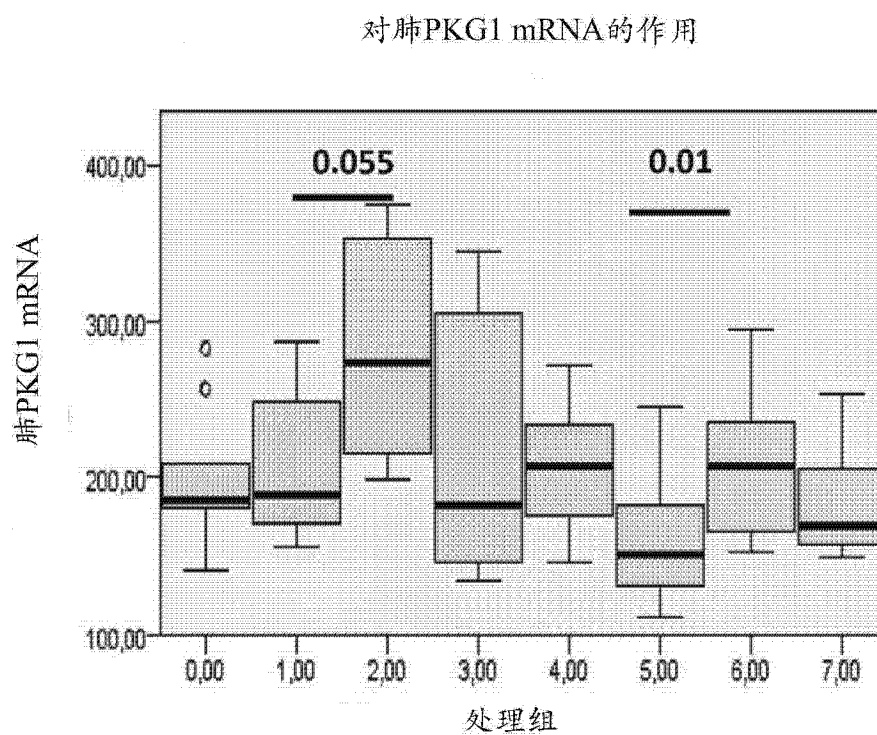
图 17

对肺ACE2 mRNA的作用



- 0=第7天的对照
- 1=第7天的MCT
- 2=第7天的MCT+OCA
- 3=第7天的MCT+他达拉非
- 4=第28天的对照
- 5=第28天的MCT
- 6=第28天的MCT+OCA
- 7=第28天的MCT+他达拉非

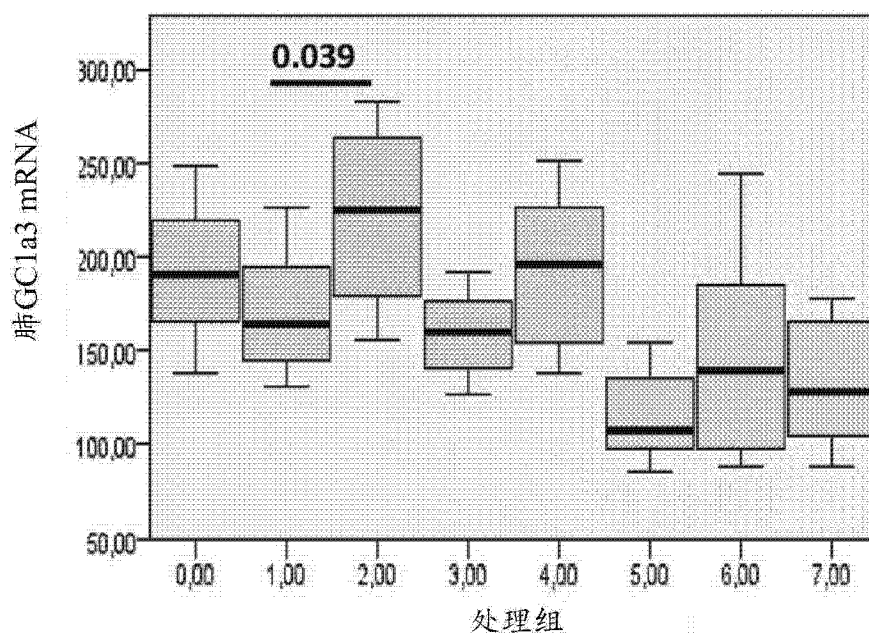
图 18



- 0=第7天的对照
- 1=第7天的MCT
- 2=第7天的MCT+OCA
- 3=第7天的MCT+他达拉非
- 4=第28天的对照
- 5=第28天的MCT
- 6=第28天的MCT+OCA
- 7=第28天的MCT+他达拉非

图 19

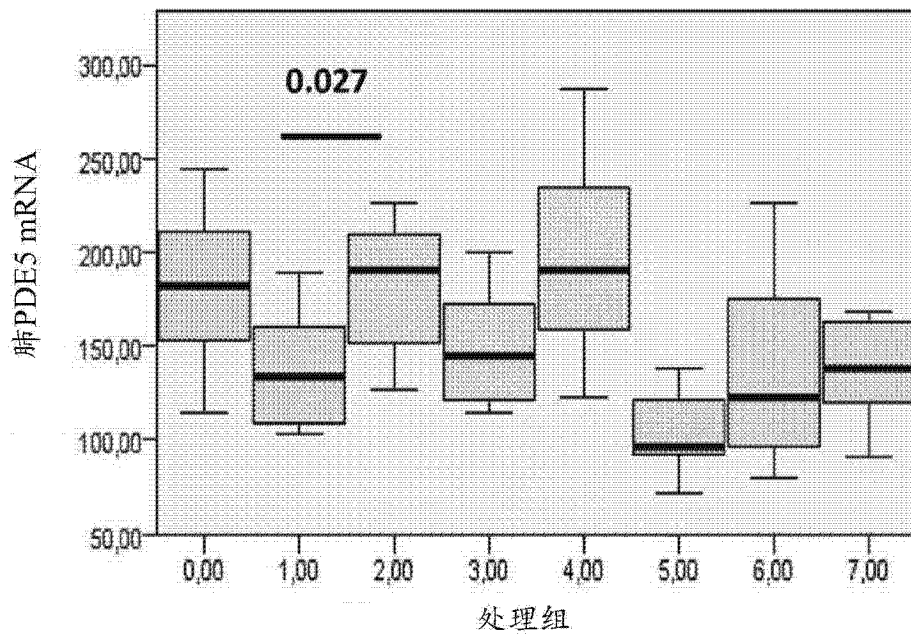
对肺GC1a3 mRNA的作用



- 0=第7天的对照
- 1=第7天的MCT
- 2=第7天的MCT+OCA
- 3=第7天的MCT+他达拉非
- 4=第28天的对照
- 5=第28天的MCT
- 6=第28天的MCT+OCA
- 7=第28天的MCT+他达拉非

图 20

对肺PDE5 mRNA的作用



0=第7天的对照
1=第7天的MCT
2=第7天的MCT+OCA
3=第7天的MCT+他达拉非
4=第28天的对照
5=第28天的MCT
6=第28天的MCT+OCA
7=第28天的MCT+他达拉非

图 21

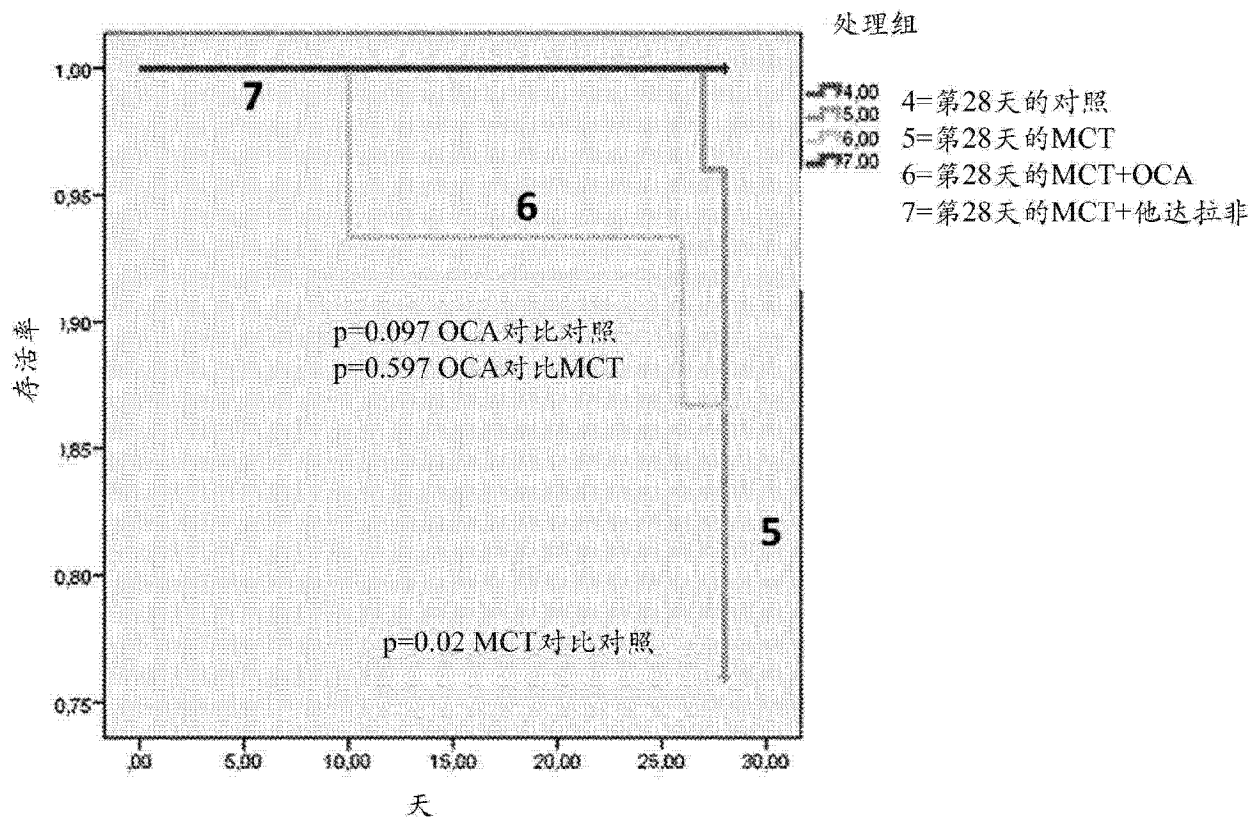


图 22